

**Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.**

Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Petra Sklenářová**

**Účinek surfaktinu na lipidovou složku cytoplazmatické  
membrány *Bacillus subtilis***

Effect of surfactin on the lipid moiety of *Bacillus subtilis*  
cytoplasmic membrane

**Diplomová práce**

Vedoucí závěrečné práce:  
RNDr. Gabriela Seydlová, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 08. 2014

Podpis

Tato diplomová práce by nemohla vzniknout bez odborného vedení, cenných rad a konzultací RNDr. Gabriely Seydlové, PhD., které si dovoluji touto cestou velice poděkovat. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Beranové, PhD., RNDr. Radovanu Fišerovi, PhD., Lucii Jánské, Bc. Dominiku Pinkasovi a všem členům mikrobiologické pracovní skupiny pod vedením Doc. RNDr. Ivo Konopáska, CSc. za praktické rady a ochotnou pomoc při vypracování této diplomové práce.

Za odbornou pomoc a poskytnutí přístrojového vybavení pro LC/MS a GC/MS analýzy děkuji Doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, PhD., Prof. RNDr. Pavlu Coufalovi, PhD., Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a Mgr. Petru Kozlíkovi z Katedry analytické chemie PřF UK v Praze.

Diplomová práce vznikala v letech 2012 – 2014 za přispění grantového projektu GAČR 13-18051P.

## ABSTRAKT

Surfaktin, sekundární metabolit produkovaný bakterií *Bacillus subtilis*, je povrchově aktivní látka a antibiotikum, které permeabilizuje membránovou dvouvrstvu. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaké adaptivní změny na úrovni lipidové složky cytoplazmatické membrány mohou přispívat k přežití *B. subtilis* v koncentracích surfaktinu, které bakterie jiných druhů zabíjí. Neprodukční kmen *B. subtilis* 168 byl kultivován v přítomnosti dvou různých subletálních koncentrací surfaktinu (350 a 650 µg/ml) izolovaného z kultury produkčního kmene *B. subtilis* ATCC 21332. Přídavek surfaktinu do média vedl v závislosti na koncentraci k zástavě růstu exponenciální kultury na 40 min (350 µg/ml), resp. 3 h (650 µg/ml) a poté se růst obnovil se změněnou dobou zdvojení. Nižší koncentrace způsobila 20% urychlení růstu, u vyšší naopak došlo k prodloužení doby zdvojení na dvojnásobek oproti kontrole. Surfaktin vyvolal v cytoplazmatické membráně zásadní změny ve složení fosfolipidů. Došlo ke snížení podílu majoritního fosfolipidu membrány fosfatidylglycerolu a naopak zvýšení podílu fosfatidyletanolaminu, u koncentrace surfaktinu stimulující růst se navíc výrazně navýšil podíl kyseliny fosfatidové. Měření kinetiky lyze lipozómů tvořených lipidy mimikujícími složení membrány vystavené surfaktinu prokázalo, že zvýšení podílu fosfatidyletanolaminu oslabuje účinek surfaktinu na membránu. Analýza mastných kyselin ukázala, že při působení stimulační koncentrace došlo k výraznému poklesu podílu větvených mastných kyselin. Důsledky těchto změn na fluiditu membrány byly zjišťovány pomocí měření ustálené anizotropie fluorescence, která u izolované lipidové frakce prokázala zvýšenou rigiditu. Zjištěné vlastnosti membrány lze považovat za adaptivní změny, které mohou přispívat k toleranci k surfaktinu.

### Klíčová slova:

surfaktin, *Bacillus subtilis*, cytoplazmatická membrána, fosfolipidy, fluidita

## ABSTRACT

Surfactin, a secondary metabolite produced by *Bacillus subtilis*, is a surface active compound and antibiotic permeabilizing membrane bilayer. The aim of this study was to reveal the self-resistance strategy at the level of the lipid moiety of cytoplasmic membrane, which *B. subtilis* employs to combat surfactin in concentrations that are lethal for other bacterial species. Non-producing strain *B. subtilis* 168 was cultivated in the presence of two different sublethal concentrations of surfactin (350 a 650 µg/ml), which was isolated from the culture broth of *B. subtilis* ATCC 21332. Presence of surfactin in the medium resulted in a concentration dependent lag phase, which took 40 min (350 µg/ml) and 3 h (650 µg/ml), respectively. Afterwards, the culture grew with the altered doubling time of 44 min (350 µg/ml) and 126 min (650 µg/ml), respectively. Surfactin induced substantial changes in the phospholipid composition of the cytoplasmic membrane. The proportion of the major phospholipid component phosphatidylglycerol decreased and inversely, the level of phosphatidylethanolamine increased. Interestingly, the content of phosphatidic acid rose considerably in the presence of surfactin concentration causing stimulation of *B. subtilis* growth (350 µg/ml). Liposome leakage assay using phospholipids mimicking the *B. subtilis* membrane adapted to surfactin showed that the higher proportion of phosphatidylethanolamine attenuates the permeabilizing effect of surfactin on the membrane. The fatty acid analysis revealed that the presence of surfactin in the concentration of 350 µg/ml led to decrease in the proportion of branched-chain fatty acids. Steady state fluorescence anisotropy of DPH labelled membrane lipids confirmed the higher rigidity in the aliphatic chain region. We concluded that the observed adaptive modifications might provide self-tolerance to the membrane active surfactin.

### Key words:

surfactin, *Bacillus subtilis*, cytoplasmic membrane, phospholipids, fluidity

## **OBSAH**

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>13</b>
<b>3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>14</b>
3.1 Biosurfaktanty .....	14
3.2 Struktura a vlastnosti surfaktinu.....	15
3.2.1 Struktura surfaktinu .....	15
3.2.2 Vlastnosti surfaktinu .....	16
3.3 Syntéza surfaktinu .....	19
3.4 Interakce surfaktinu s membránou .....	22
3.5 Význam surfaktinu pro producenta .....	23
3.6 Potenciální využití surfaktinu .....	27
3.6.1 Využití surfaktinu v lékařství .....	27
3.6.2 Průmyslové využití surfaktinu .....	29
<b>4 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIÁL .....</b>	<b>31</b>
4.1 Bakteriální kmeny .....	31
4.2 Kultivační půdy .....	31
4.2.1 Živný bujón Oxoid.....	31
4.2.2 Minerální médium dle Coopera .....	32
4.2.3 Minerální médium dle Coopera s přídavkem aktivního uhlí .....	32
4.2.4 Minerální médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů .....	33
4.3 Pevné půdy .....	33
4.3.1 Šikmý agar .....	33
4.3.2 Živný agar se surfaktinem.....	33
4.3.3 Sporulační agar .....	34
<b>METODY.....</b>	<b>35</b>
4.4 Sterilizace .....	35
4.5 Příprava sporových konzerv .....	35
4.6 Kultivace bakterií a růstová křivka .....	36

4.6.1	Růst <i>B. subtilis</i> v tekutém médiu .....	36
4.6.2	Růst <i>B. subtilis</i> na pevné půdě .....	36
4.7	Stanovení počtu buněk výsevem na plotny .....	37
4.8	Kapkový test.....	37
4.9	Izolace surfaktinu .....	38
4.10	Stanovení koncentrace surfaktinu (LC/MS).....	39
4.11	Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro <i>B. subtilis</i> 168 .....	40
4.12	Izolace a analýza lipidové frakce cytoplazmatických membrán.....	40
4.12.1	Izolace lipidové frakce .....	40
4.12.2	Tenkovrstevná chromatografie (TLC) .....	41
4.12.2.1	Příprava chromatografických desek .....	41
4.12.2.2	Jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě .....	42
4.12.3	Kvantitativní stanovení lipidického fosfátu .....	42
4.12.4	Plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) ...	44
4.12.4.1	Derivatizace mastných kyselin .....	44
4.12.4.2	Analýza methylesterů mastných kyselin .....	45
4.12.5	Izolace cytoplazmatickým membrán .....	45
4.12.5.1	Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA .....	46
4.12.5.2	Stanovení poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně .....	48
4.12.6	Lyze lipozómů .....	49
4.12.7	Měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH .....	50
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>52</b>
5.1	Růst <i>B. subtilis</i> 168 v tekutém médiu a na pevné půdě.....	53
5.2	Optimalizace produkce a izolace surfaktinu z kultury <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 .....	55
5.3	Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro <i>B. subtilis</i> 168 .....	59
5.3.1	Kapkový test .....	59
5.3.2	Růst <i>B. subtilis</i> 168 na pevném médiu se surfaktinem .....	62
5.3.2.1	Růst <i>B. subtilis</i> v přítomnosti surfaktinu a výběr časových intervalů pro analýzu cytoplazmatických membrán.....	64
5.4	Adaptace cytoplazmatické membrány <i>B. subtilis</i> 168 k surfaktinu .....	66
5.4.1	Složení polárních hlav fosfolipidů.....	66
5.4.2	Složení mastných kyselin cytoplazmatické membrány .....	69
5.4.3	Stanovení poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně .....	72
5.4.4	Lyze lipozómů .....	73



5.4.5	Stanovení ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH.....	75
5.4.5.1	$r_{ss}$ DPH v izolovaných cytoplazmatických membránách.....	75
5.4.5.2	$r_{ss}$ DPH v izolované lipidové frakci membrány .....	77
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>88</b>

## SEZNAM ZKRATEK

<i>a</i>	anteizo- větvení mastných kyselin
<b>Asp</b>	kyselina asparagová
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BCA</b>	kyselina bicinchoninová (Bicinchoninic acid)
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit
<b>CL</b>	kardiolipin
<b>CMC</b>	kritická micelární koncentrace (Critical Micelle Concentration)
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>DNáza</b>	deoxyribonukleáza
<b>DPH</b>	1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien
<b>DPPE</b>	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
<b>DPPG</b>	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediamine-tetraacetic acid)
<b>GC</b>	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
<b>Glu</b>	kyselina glutamová
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
<i>i</i>	iso-větvení mastné kyseliny
<b>LC</b>	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
<b>Leu</b>	leucin
<b>lysylPG</b>	lysylfosfatidylglycerol
<b>MIC</b>	minimální inhibiční koncentrace (Minimal Inhibitory Concentration)
<b>MK</b>	mastná kyselina
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<b>NRPS</b>	neribozomální peptidické syntetázy (Nonribosomal Peptide Synthesis)
<b>OD</b>	optická denzita
<b>PA</b>	kyselina fosfatidová
<b>PE</b>	fosfatidyletanolamin
<b>PG</b>	fosfatidylglycerol
<b>PMSF</b>	phenylmethylsulfonylfluorid

<b>ppan</b>	fosfopantethein (Phosphopantethein)
<b>PS</b>	fosfatidylserin
<b>RNáza</b>	ribonukleáza
<b>RND</b>	rodina multidrogových efluxních pump (Resistance, Nodulation and Cell Division)
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
<b>rpm</b>	počet otáček za minutu (rounds per minute)
<b>r<sub>ss</sub> DPH</b>	ustálená anizotropie fluorescence sondy DPH
<b>Sdp</b>	Sporulation delaying protein
<b>Sfk</b>	Sporulation killing factor
<b>SIM</b>	Selected Ion Measurement
<b>TE</b>	thioesteráza
<b>TLC</b>	tenkovrstevná chromatografie (Thin Layer Chromatography)
<b>Val</b>	valin

# 1 ÚVOD

Rezistence bakterií k používaným antibiotikům neustále stoupá, a proto výzkum a vývoj nových léků působících na rezistentní kmeny bakterií vyžaduje stále větší pozornost a finanční podporu. Vyvinutí nového léku a jeho uvedení do praxe je velice nákladné, proto se v poslední době uvažuje o použití biologických látek mikrobiálního původu, jakožto možných levnějších a účinnějších terapeutických agens.

Skupinou látek, které se staly v poslední době středem zájmu vědců a mezi něž také patří jedny ze tří nedávno uvedených antibiotik do humánní medicíny, jsou antimikrobiální lipopeptidy, k nimž se řadí i surfaktin. Surfaktin je amfipatický lipoheptapeptid, který je produkován během stacionární fáze růstu bakterií *Bacillus subtilis*. Tato látka se vyznačuje řadou biologických účinků s velkým potenciálem pro komerční využití. Mezi nejvíce studované účinky patří antimikrobiální, protinádorová a antimykoplazmatická aktivita surfaktinu. Mnoho dalších studií se zabývá jeho případným využitím v oblasti průmyslu, zemědělství a ochraně životního prostředí. Jednou z nevyřešených otázek, která zatím omezuje jeho širší použití, je neznalost účinného mechanismu rezistence producenta k této membránově aktivní látce. Tato znalost je nutná pro možné uvedení této látky do užívání v lékařství, ale mohla by být využita i pro přípravu mutantního kmene, který by díky vyšší rezistenci dosahoval vyšší produkce surfaktinu.

Zásahovým místem surfaktinu je cytoplazmatická membrána, kterou destabilizuje a rozrušuje. Lze tedy důvodně předpokládat, že rezistence producenta by se mohla realizovat modifikací zásahové místa. Hlavním cílem diplomové práce proto bylo najít subletální koncentraci surfaktinu a charakterizovat adaptivní mechanismy především lipidové složky cytoplazmatické membrány *B. subtilis* 168 vyvolané přítomností surfaktinu v prostředí. Buňky byly účinkům surfaktinu vystaveny v době exponenciálního růstu kultury, která se vyznačuje přítomností fyziologicky homogenních buněk, které tak mohou na přítomnost surfaktinu reagovat stejným mechanismem adaptace. Odpověď na přítomnost toxické látky v médiu je tak dobře definovatelná.

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Optimalizace produkce a izolace surfaktinu z kultury *Bacillus subtilis* ATCC 21332.
2. Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro *Bacillus subtilis* 168.
3. Analýza fosfolipidových tříd v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* 168 rostoucího v přítomnosti surfaktinu.
4. Analýza složení mastných kyselin membránových fosfolipidů.
5. Stanovení poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* 168.
6. Ověřit význam adaptivních změn ve složení fosfolipidů pomocí měření kinetiky lyze lipozómů.
7. Stanovení fluidity izolovaných cytoplazmatických membrán a lipidické frakce cytoplazmatických membrán metodou ustálené anizotropie fluorescence DPH.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Biosurfaktanty

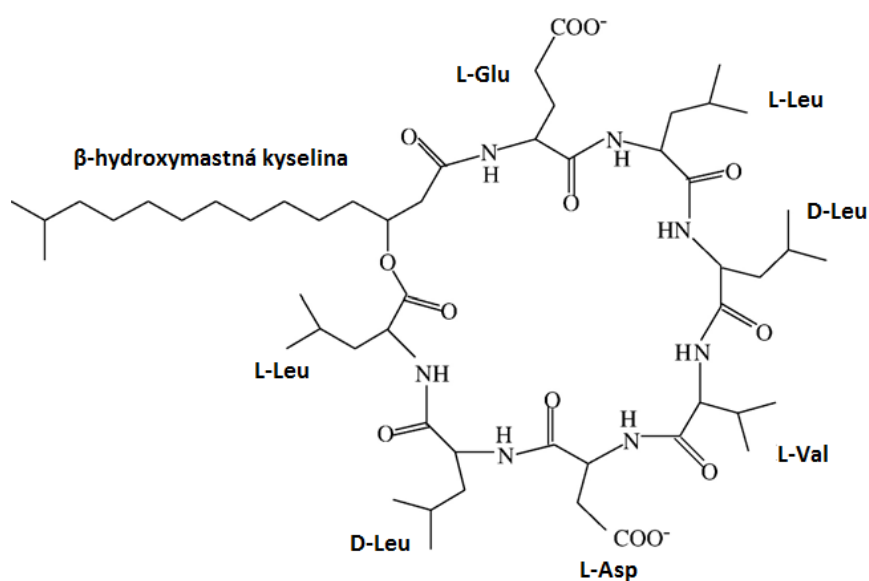
Biosurfaktanty jsou amfipatické povrchově aktivní molekuly, které jsou produkovány různými druhy mikroorganismů. Jejich nejdůležitější vlastností je schopnost hromadit se na rozhraní dvou látek a snižovat jejich povrchové napětí a napětí na rozhraní dvou fází. Biosurfaktanty mají pro své producenty několikero funkcí, mj. usnadňují buňkám přístup k živinám v případě nepříznivých životních podmínek. Produkce mikrobiálních biosurfaktantů byla popsána u rodů *Pseudomonas*, *Candida*, *Acinetobacter*, *Bacillus* a dalších. Poslední zmiňovaný rod *Bacillus* patří mezi jedny z nejvýznamnějších producentů biosurfaktantů. Produkuje několik druhů povrchově aktivních látek, jejichž produkce je závislá na druhu bakterie, např. bakterie *B. licheniformis* produkuje biosurfaktant lichenysin, *B. polymyxa* polymyxin a *B. subtilis* surfaktin, který patří mezi nejsilnější biosurfaktanty vůbec (Cameotra & Makkar 2004).

V současné době je výzkum v oblasti biosurfaktantů soustředěn na jejich potenciální využití např. při těžbě ropy či tzv. bioremediacích, při kterých dochází pomocí mikroorganismů k degradaci toxických látek na látky netoxické. Využití těchto látek v bioremediacích má velký potenciál díky jejich snadné a levné produkci, popř. produkci *in situ*, a také snadné biologické degradaci z prostředí. Celkově jsou tyto látky netoxické nebo méně toxické než chemicky syntetizované surfaktanty a mají vyšší toleranci k nepříznivým podmínkám jako je vysoká teplota či pH. Proto se uvažuje o jejich dalším využití v zemědělství, kosmetice, potravinářském průmyslu či při výrobě léků (Banat *et al.* 2000; Mulligan 2005). Jejich velký význam pro potenciální komerční využití spočívá také v celé řadě jejich biologických účinků, které vyplývají z jejich povrchové aktivity (Gudina *et al.* 2013).

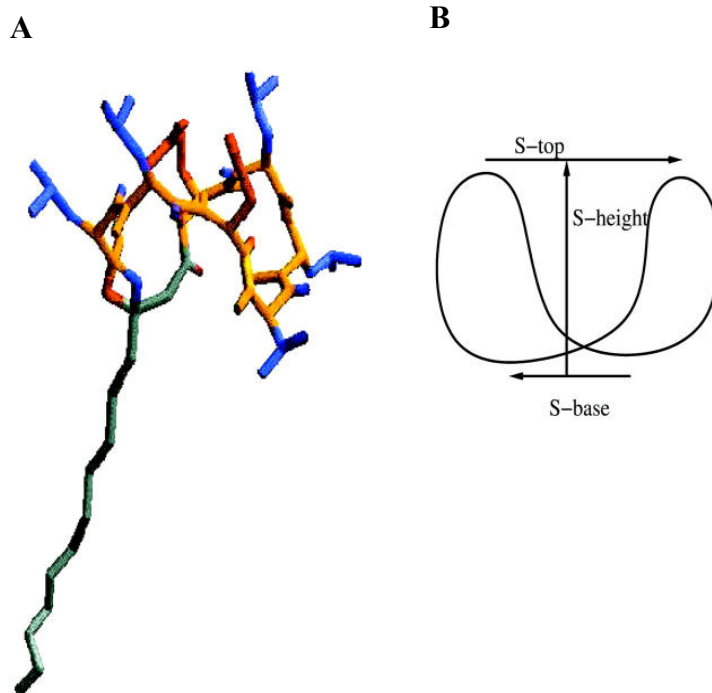
## 3.2 Struktura a vlastnosti surfaktinu

### 3.2.1 Struktura surfaktinu

Surfaktin je sekundární metabolit produkovaný bakterií *Bacillus subtilis* ve stacionární fázi růstu. Tento biosurfaktant je amfipatický cyklický lipopeptid tvořený heptapeptidem a  $\beta$ -hydroxy mastnou kyselinou. Peptidická část je tvořena sedmi aminokyselinami o sekvenci L-Glu, L-Leu, D-Leu, L-Val, L-Asp, D-Leu, L-Leu (Obr. 1). V polohách 1 a 5 (Glu a Asp) se nacházejí hydrofilní aminokyseliny, které tvoří minoritní hydrofilní doménu, naproti tomu v polohách 2, 3, 4, 6 a 7 se nacházejí hydrofobní aminokyseliny, tvořící společně s  $\beta$ -hydroxy mastnou kyselinou majoritní hydrofobní doménu.  $\beta$ -hydroxy mastná kyselina se váže pomocí své hydroxylové skupiny na karboxylovou skupinu C-koncového leucinu za vzniku laktonového kruhu (Kakinuma *et al.* 1969a; Kakinuma *et al.* 1969b; Kakinuma *et al.* 1969c; Kakinuma *et al.* 1969d). Trojrozměrná struktura surfaktinu byla určena pomocí metody  $^1\text{H}$ -NMR (Obr. 2). Z této struktury je patrné uspořádání aminokyselin do tvaru tzv. „jezdeckého sedla“, na jehož vrcholech ční aminokyselinové zbytky kyseliny glutamové a aspartové (1 a 5), na něž se mohou vázat dvojmocné kationty (Nicolas 2003; Tsan *et al.* 2007).



**Obr. 1** Primární struktura surfaktinu. Upraveno podle Kell *et al.* (2007).



**Obr. 2** Trojrozměrný model surfaktinu uspořádaný do tvaru „jezdeckého sedla“. A – Žlutě je vyznačen laktonový kruh, červeně hydrofilní aminokyselinové zbytky, modře hydrofobní aminokyselinové zbytky a zeleně je vyznačena  $\beta$ -hydroxy mastná kyselina. B – Tvar a orientace jsou popsány pomocí tří vektorů S-top, S-height a S-base. Vektor S-base popisuje míru otevření struktury sedla, S-height popisuje míru rotace tohoto sedla a v neposlední řadě S-top, který určuje velikost těchto vektorů. Převzato a upraveno podle Nicolas (2003).

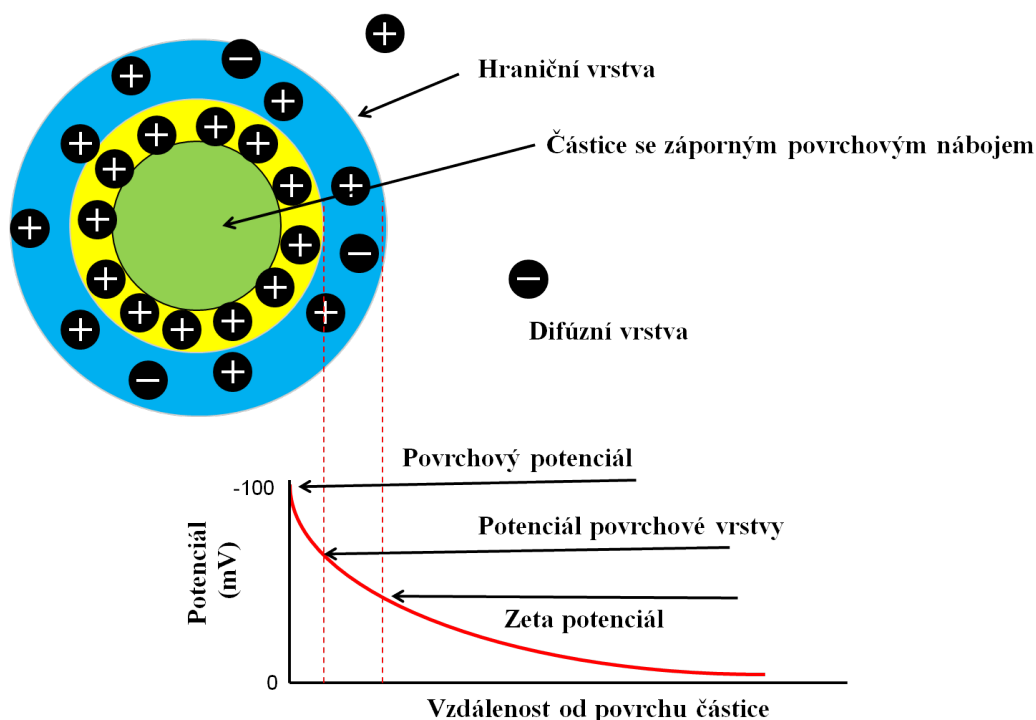
Přírodní izolát surfaktinu je vždy směsí několika izoformem, které se liší délkou alifatického řetězce mastné kyseliny. Tento řetězec může mít délku od 12 do 16 atomů uhlíku. Variabilita v délce  $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny se odvíjí od použitého bakteriálního kmene a dále od nastavených kultivačních podmínek, jako je zdroj uhlíku a dusíku, množství dvojmocných iontů, hodnota pH, kultivační teplota nebo míra aerace. V závislosti na produkčním bakteriálním kmeni či v závislosti na kultivačních podmínkách existuje variabilita i v primární struktuře peptidového řetězce především u aminokyselin v polohách 2, 4 a 7 (Banat 1995; Peypoux *et al.* 1999; Dufour *et al.* 2005).

### 3.2.2 Vlastnosti surfaktinu

Surfaktin je velmi silná povrchově aktivní látka, snižuje povrchové napětí vody z hodnoty  $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  na  $27 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  už při koncentraci nižší než  $20 \text{ } \mu\text{M}$ , oproti tomu nejpoužívanější detergent Triton X-100 snižuje povrchové napětí vody z hodnoty  $72 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  na  $33 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  až při koncentraci  $15 \text{ mM}$  (Peypoux *et al.* 1999; Li *et al.* 2000).



Surfaktin velmi ochotně tvoří micely již při koncentraci 7,5 - 20  $\mu\text{M}$ , udávané rozmezí hodnot je závislé na použitém roztoku a jeho pH (Knoblich *et al.* 1995). Schopnost tvorby micel lze vyjádřit pomocí hodnoty CMC (Critical Micelle Concentration, CMC), jejíž hodnota u surfaktinu odpovídá již zmiňovaným 7,5 – 20  $\mu\text{M}$ , pro srovnání u Tritonu X-100 se hodnota CMC pohybuje kolem 230  $\mu\text{M}$  (Perkowski *et al.* 1995; Heerklotz & Seelig 2001). Při vyšších koncentracích surfaktinu v roztoku se vznikající micely shlukují do složitějších agregátů. Důležitou charakteristikou micel je tzv. agregační číslo, které udává počet molekul dané látky účastnících se tvorby micely. Agregační číslo surfaktinu se pohybuje mezi hodnotami 11 – 20, přičemž může dosáhnout i hodnoty desetinásobné (Shen *et al.* 2009; Zou *et al.* 2010). Micely jsou, co se týče velikosti, tvaru a konfigurace, velmi různorodé. Jejich velikost se pohybuje u menších agregátů v rozmezí 5 – 9 nm (Shen *et al.* 2009) a u větších může dosáhnout velikosti až 160 nm (Knoblich *et al.* 1995). Tvar micel se může měnit od kulovitých struktur, přes elipsoidní až po cylindrické struktury, kdy základem micely je vždy jádro tvořené hydrofobními zbytky (mastné kyseliny) a povrch je tvořen peptidickým cyklem (Knoblich *et al.* 1995; Shen *et al.* 2009). Při použití různých dvojmocných kationtů ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) byly pozorovány různě velké surfaktinové agregáty. Přidáním některého z iontů do roztoku surfaktinu dochází ke snížení CMC. Přítomné ionty neutralizují negativní náboj na aspartátu a glutamátu a snižují zeta (elektrokinetický) potenciál surfaktinu, což usnadňuje tvorbu micel. Zeta potenciál udává rozdíl mezi povrchovým potenciálem pevně nabitě částice a potenciálem hraniční vrstvy, kolem které se díky náboji vytvoří nabitá dvouvrstva, kdy náboj na povrchu částice přitahuje ionty s opačným nábojem z roztoku (Obr. 3). Zeta potenciál surfaktinu je za normálních podmínek -52 mV, po přidání dvojmocných iontů dochází ke zvýšení potenciálu na hodnoty mezi -40 – -35 mV (Arutchevi *et al.* 2014; Fan *et al.* 2014).

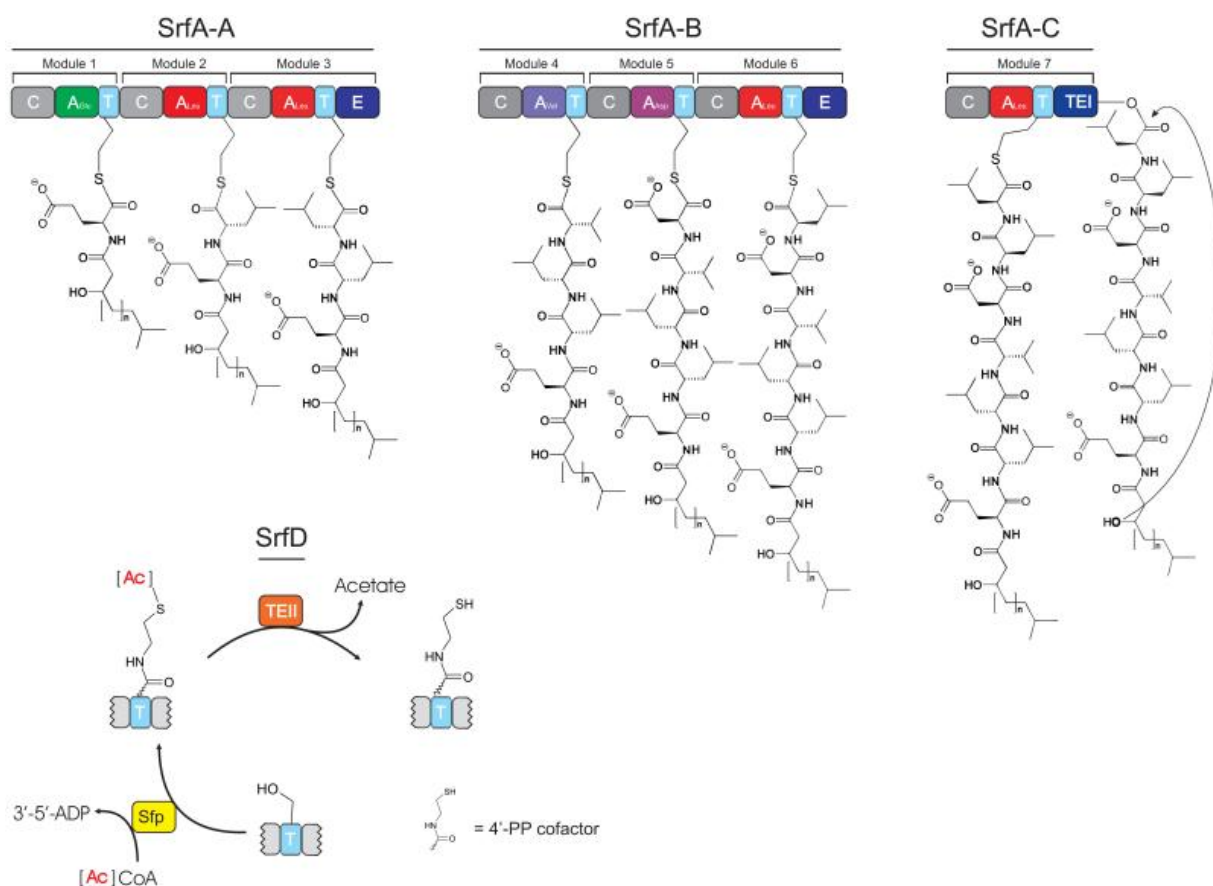


**Obr. 3** Schéma zeta potenciálu částice v kapalině.

Surfaktin je velice stabilní látka. Vykazuje vysokou stabilitu i při vysokých teplotách nebo v přítomnosti zvýšené koncentraci solí (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008). Při vystavení surfaktinu teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny nedochází ke snižování jeho povrchové aktivity. Dokonce ani podmínky v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut nesnižují jeho aktivitu, naopak dochází k jejímu mírnému zvýšení (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008). Povrchová aktivita surfaktinu je ovlivňována především hodnotou pH, kdy při pH 2 – 4 nevykazuje téměř žádnou povrchovou aktivitu, naopak po zvýšení na hodnotu pH 5 dojde k prudkému nárůstu jeho aktivity a tím ke snížení povrchového napětí na rozhraní voda/vzduch. Co se týče rozpustnosti surfaktinu je velice dobře rozpustný v běžných rozpouštědlech jako jsou metanol, etanol, aceton, chloroform či dichlormetan (Kim *et al.* 1997; Abdel-Mawgoud *et al.* 2008). Na druhou stranu lze surfaktin rozpustit i ve vodných roztocích, u kterých je však nutné upravit pH na hodnotu 8 – 8,5. Rozpustnost v alkalických vodných roztocích je u surfaktinu připisována jeho kyselé povaze (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008).

### 3.3 Syntéza surfaktinu

Mechanismus syntézy surfaktinu poprvé navrhnul Kluge *et al.* (1988), kdy se správně domníval, že syntéza surfaktinu probíhá neribozomální cestou pomocí multienzymatických komplexů, stejně jako je tomu i u dalších peptidových sekundárních metabolitů produkovaných bakteriemi. Tyto komplexy se nazývají neribozomální peptidické syntetázy (Nonribosomal peptide synthetases, NRPS) a jsou kódovány operonem *surfA* o velikosti 25 kb, který kóduje všechny čtyři podjednotky surfaktin syntetázy (SrfA, SrfB, SrfC a SrfD) (Marahiel *et al.* 1997). Jednotlivé enzymy SrfA ( $E_{1A}$ , 402 kDa), SrfB ( $E_{1B}$ , 401 kDa), SrfC ( $E_2$ , 144 kDa) tvoří dohromady sedm modulů, které jsou zodpovědné za připojení jednotlivých aminokyselinových zbytků (Obr. 4) (Menkhaus *et al.* 1993; Marahiel *et al.* 1997). Enzym SrfA nese tři moduly aktivující připojení aminokyselinového zbytku L-Glu a dvou aminokyselinových zbytků L-Leu a D-Leu, enzym SrfB nese opět tři moduly pro připojení aminokyselinových zbytků tentokrát L-Val, L-Asp a D-Leu a poslední enzym SrfC, který nese jeden modul pro připojení C-koncového L-Leu. Poslední podjednotka surfaktin syntetázy, enzym SrfD ( $E_3$ , 40 kDa), někdy nazývána též jako externí thioesteráza (Srf-TEII), je zodpovědná za připojení  $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny k L-Leu. Kromě toho funguje jako kontrolní a opravná doména (Steller *et al.* 2004; Koglin *et al.* 2008).



**Obr. 4** Schéma syntézy surfaktinu. Multienzymatický komplex se skládá ze sedmi modulů, které jsou specifické pro začlenění všech sedmi aminokyselin. Komplex je tvořen z celkem dvaceti čtyř domén pěti různých typů (C, A, T, E a TE I), každá z těchto domén je odpovědná za jednu chemickou reakci. Během prvních dvaceti tří reakcí dochází k prodlužování peptidového řetězce a v poslední reakci dochází, pomocí poslední domény, k cyklizaci a uvolnění surfaktinu z multienzymového komplexu. Poslední doménou je TE II, externí thioesteráza, která je odpovědná za aktivaci celé syntézy a má též opravnou aktivitu. Převzato z Koglin *et al.* (2008).

Jednotlivé moduly multienzymatického komplexu se skládají z celkem dvaceti čtyř domén. Každá z těchto domén má svoji nepostradatelnou funkci. A-doména (adenylation domain) je odpovědná za adenylaci příslušné aminokyseliny a tím i za její aktivaci za vzniku aminoacyl-adenylátu (Marahiel *et al.* 1997). Tento reaktivní produkt je následně přenesen na další doménu, již je T-doména (peptidyl carrier protein domain), která interaguje s A-doménou a zároveň je k ní připojen 4'-fosfopantetheinový kofaktor (phosphopantethein, ppan), ke kterému se kovalentně váže aktivovaná aminokyselina. Tento 4'-fosfopantetheinový kofaktor slouží jako výkyvné rameno, které přenáší rostoucí peptidový řetězec mezi jednotlivými moduly (Sieber & Marahiel 2005). 4'-fosfopantetheinový kofaktor je kódován *sfp* genem, který je zcela esenciální pro produkci surfaktinu. Vzhledem k tomu, že bakterie

*B. subtilis* 168 nese bodovou mutaci v tomto *sfp* genu, není schopna produkce surfaktinu, i když nese veškerou genetickou výbavu nutnou k jeho syntéze (Nakano *et al.* 1992). Dále je zde přítomna C-doména (condensation domain), která je nezbytná pro vytvoření peptidové vazby a je tedy zodpovědná za prodlužování peptidového řetězce (Schwarzer & Marahiel 2001; Sieber & Marahiel 2005). Poslední nezbytnou doménou je TE I-doména (thioesterase domain), díky níž dochází k ukončení syntézy a k uvolnění peptidu z proteinového komplexu. V neposlední řadě tato doména katalyzuje reakci spojením leucinu a  $\beta$ -hydroxymastné kyseliny za vzniku laktonového kruhu (Marahiel *et al.* 1997; Sieber & Marahiel 2005). Jak je patrné z Obr. 4, k některým T-doménám těsně přiléhají E-domény (epimerization domain), které patří mezi tzv. pomocné domény a jsou odpovědné za racemizaci aminokyselin vázaných na T-doménu (Schwarzer & Marahiel 2001). Poslední nezávislou doménou je externí TE II-doména, neboli enzym SrfD. Tato doména je odpovědná za aktivaci celé syntézy surfaktinu. Aktivovat syntézu surfaktinu je schopna díky přenosu acetyl-CoA na modul SrfA. V neposlední řadě funguje také jako opravná jednotka eliminující nesprávné nabíjení 4'-fosfopantetheinového kofaktoru přítomného v reakčních centrech peptidové syntetázy (Steller *et al.* 2004; Koglin *et al.* 2008).

### 3.4 Interakce surfaktinu s membránou

Surfaktin díky své amfifilní povaze (přítomnost negativního náboje spolu s velkou hydrofobní částí) a povrchové aktivitě má schopnost interagovat s membránou, zanořovat se do ní, až ji úplně rozrušit (Bernheim & Avigad 1970). Celkově mechanismus destabilizace a míra poškození membrány surfaktinem závisí na koncentraci surfaktinu, ale i na složení cílové membrány. Polární hlavy a délka řetězců mastných kyselin fosfolipidů v cílové membráně mají zásadní vliv na schopnost surfaktinu pronikat do cytoplazmatické membrány (Deleu *et al.* 2003; Brasseur *et al.* 2007).

Náboje polárních hlav fosfolipidů, prostorový tvar molekul a jejich celkové zastoupení v membráně hrají důležitou roli při interakci se surfaktinem (Buchoux *et al.* 2008). Fosfatidylcholin a fosfatidyletanolamin mají náboj neutrální a fosfatidylserin a fosfatidylglycerol nesou náboj negativní. Mísitelnost surfaktinu s molekulami fosfolipidů klesá v závislosti na zastoupení polárních hlav fosfolipidů v membráně směrem od fosfatidylcholin → fosfatidyletanolamin → fosfatidylserin (Bouffieux *et al.* 2007). Dále byla prokázána snížená penetrace surfaktinu díky přítomnosti kardiolipinu v cytoplazmatické membráně. Tento fosfolipid nese dva negativní náboje a může tak bránit stejně nabitému surfaktinu interagovat s membránou. Kromě toho se kardiolipin díky své struktuře podílí na snížené fluiditě membrány (Seydlova *et al.* 2013), kterou surfaktin naopak při interakci s membránou zvyšuje (Carrillo *et al.* 2003).

Dále interakce mezi surfaktinem a fosfolipidy závisí na délce řetězce mastné kyseliny, a to jak u surfaktinu, tak u přítomných mastných kyselin fosfolipidů v membráně. S rostoucí délkou řetězce mastných kyselin fosfolipidů se snižuje i mísitelnost surfaktinu s membránou (Bouffieux *et al.* 2007). Surfaktin tak snáze rozrušuje membrány tvořené fosfolipidy s kratšími alifatickými řetězci (Grau *et al.* 1999; Brasseur *et al.* 2007). Co se týče délky řetězce mastné kyseliny surfaktinu, čím je tento řetězec delší, tím účinnější je i průnik surfaktinu do membrány (Maget-Dana & Ptak 1995).

Surfaktin interaguje s lipidy především pomocí hydrofobních interakcí. Pokud jsou v okolí přítomny ionty  $\text{Ca}^{2+}$  přispívají k neutralizaci negativního náboje surfaktinu, díky čemuž dojde ke zvýšení hydrofobního charakteru surfaktinu a ten poté může pronikat hlouběji do cytoplazmatické membrány (Maget-Dana & Ptak 1995). Při nízké koncentraci surfaktinu (2  $\mu\text{M}$ ) proniká do membrány prostřednictvím interakcí s řetězci mastných kyselin fosfolipidů, následně při zvýšení koncentrace surfaktinu (9  $\mu\text{M}$ ) dochází postupně k tvorbě

dimerů a následně i micel, které narušují integritu membrány, což vede k dezorganizaci membrány a k jejímu prasknutí (Obr. 5) (Deleu *et al.* 2003). Při interakci surfaktinu s membránou dochází k masivní dehydrataci polárních hlav fosfolipidů, což má za následek narušení uspořádání fosfolipidů v membráně. Následně pak dochází k narušení celkové integrity membrány a k její destabilizaci a posléze i lyzi membrány (Carrillo *et al.* 2003).



**Obr. 5** Schéma zabudovávání surfaktinu do membránové dvouvrstvy v závislosti na koncentraci surfaktinu. A) nízká koncentrace surfaktinu, B) vysoká koncentrace surfaktinu blíží se CMC. Upraveno podle Deleu *et al.* (2003).

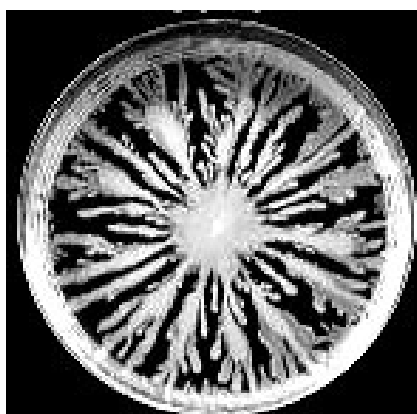
Interakci surfaktinu s membránou lze také popsat za použití parametru  $R_b$ , tento parametr vyjadřuje poměr množství lipidů v membráně vůči množství surfaktinu vázaného na membránu. K narušení cytoplasmatické membrány dochází už při  $R_b = 0,05$  a tomu odpovídající koncentraci surfaktinu  $2 \mu\text{M}$ . Při zvýšení koncentrace surfaktinu a tomu odpovídající  $R_b = 0,15$  se v membráně vytvářejí shluky surfaktinu, které narušují stabilitu membrány. Při dalším zvýšení koncentrace surfaktinu na  $9 \mu\text{M}$  a  $R_b = 0,22$  začíná membrána lyzovat, k úplné lyzi membrány dochází při  $R_b = 0,43$  a koncentraci  $11 \mu\text{M}$  (Heerklotz & Seelig 2007).

### 3.5 Význam surfaktinu pro producenta

Surfaktin je sekundární metabolit syntetizovaný ve stacionární fázi růstu. Patří mezi lipopeptidy, které jsou nejčastějším typem antibiotik produkovaných bakterií *B. subtilis*. Předpokládanými funkcemi těchto látek jakožto biosurfaktantů je zvyšování dostupnosti a využití hydrofobních ve vodě nerozpustných živin, případně mohou mít vliv na adhezi buněk k povrchům (Rosenberg & Ron 1999).

Surfaktin má nedílnou roli při tvorbě tzv. plodnic (fruiting bodies), které jsou vztyčovány na povrchu kolonií či biofilmu *B. subtilis*. Vzniklé plodnice poté slouží jako preferenční místo pro sporulaci (Branda *et al.* 2001). Kromě toho se surfaktin uplatňuje při

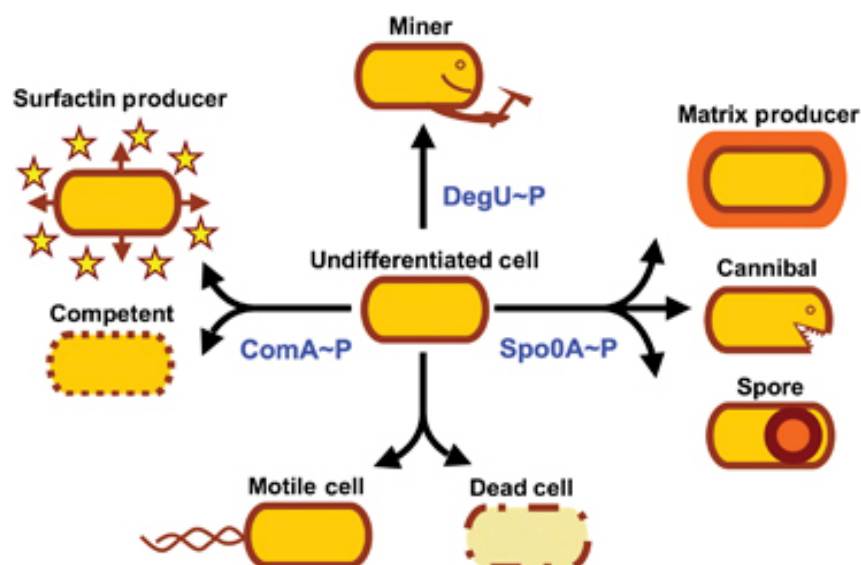
pohybu vznikajících kolonií. Buňky na okrajích kolonie se mohou pohybovat do stran klouzavým (sliding) pohybem nebo tzv. rojením (swarming) (Obr. 6), mohou tak získat lepší přístup k živinám, které jsou v okolí kolonie rychle vyčerpávány. Buňky schopné rojení vyžadují gen *swrA*, který zvyšuje aktivaci exprese genů pro syntézu bičíku a syntézu surfaktinu. Surfaktin kromě toho, že snižuje povrchové napětí před čelem kolonie, také zvyšuje transkripci genů pro flagelin, a tím je buňkám umožňován snazší pohyb po povrchu pevného agaru (Kinsinger *et al.* 2003; Ghelardi *et al.* 2012). Buňky vykazující swarming jsou schopné za dobu 5 hodin urazit vzdálenost až 3 cm (Kearns *et al.* 2004). Oproti tomu pro srovnání laboratorní kmen *B. subtilis* 168, který není producentem surfaktinu, nemá ani schopnost swarming motility (Julkowska *et al.* 2005). Dalším pohybem, které buňky v kolonii vykonávají, je klouzavý (sliding) pohyb, který je zcela nezávislý na přítomnosti bičíků, ale naopak je úplně závislý na přítomnosti surfaktinu v prostředí (Ghelardi *et al.* 2012).



**Obr. 6** Rojení (swarming) *B. subtilis* na povrchu pevného agaru. Převzato z Kinsinger *et al.* (2005).

Jednou z velmi pozoruhodných vlastností bakterie *B. subtilis* je schopnost diferenciaci buněk v rámci kolonie nebo biofilmu do různých buněčných typů, které vykonávají specializované funkce. Hlavním signálem pro aktivaci genů nutných pro diferenciaci je pokles živin v prostředí a s tím spojená změna genové exprese, což umožní buňkám delší přežití za nepříznivých podmínek. Změnou genové exprese jsou aktivovány geny pro diferenciaci buněk (Obr. 7), u kterých následně dochází k navození stavu přirozené kompetence, zahájení sporulace, produkci extracelulárních degradačních enzymů, produkci kanibalistických enzymů nebo k syntéze surfaktinu (Stein 2005; López & Kolter 2010).





**Obr. 7** Schéma diferenciacie buněk *B. subtilis*. Modře jsou uvedeny hlavní regulátory spouštějící diferenciaci jednotlivých buněk. DegU~P aktivuje produkci extracelulárních degradačních enzymů. ComA~P řídí diferenciaci buněk v producenty surfaktinu, případně vznik kompetentních buněk. Spo0A~P aktivuje produkci extracelulární matrix, vznik kanibalistických buněk nebo sporulaci. U vzniku motilních (pohyblivých) buněk není vyžadován žádný regulátor. Převzato z Lopez *et al.* (2010).

Biofilm je vysoce strukturované společenství buněk, které adherují k povrchu v trojrozměrné struktuře. Při jeho tvorbě hraje surfaktin jednu z klíčových rolí, přičemž neindukuje přímo tvorbu biofilmu, ale působí jako signální molekula pro quorum sensing (Kolter 2010). Buňky v biofilmu jsou obklopeny extracelulární matrix, kterou produkuje určitá subpopulace buněk a populace jako celek má tak lepší schopnost odolávat vyšším koncentracím antibiotik, UV záření, zvýšené teplotě či nedostatku živin (Hamon & Lazazzera 2001; Zhang *et al.* 2014). Kromě toho jsou tyto biofilmy schopné v některých případech inhibovat růst některých patogenů. Příkladem může být divoký kmen *B. subtilis*, který je schopen růst a tvořit biofilm na kořenech *Arabidopsis*. Vzniklý biofilm může díky produkovanému surfaktinu rostlinu chránit před napadením patogenními bakteriemi jako je *Pseudomonas syringae* (Bais *et al.* 2004). Produkce extracelulární matrix v rámci kolonie či biofilmu je ovlivňována přítomností surfaktinu, který způsobuje únik draselných iontů ven z buňky. Vylitím draselných iontů je aktivována kináza KinC, která spouští expresi genů syntézy extracelulární matrix. V tomto případě produkovaný surfaktin funguje právě jako signální molekula pro okolní buňky, ale také jako autoindukční signální molekula. Hromadění surfaktinu v okolí buněk je buňkami vnímáno jako signál, na který odpovídají, a tak mezi sebou komunikují – tzv. quorum sensing (López *et al.* 2009a; López *et al.* 2009c).

Při diferenciaci buněk v populaci byla pozorována parakrinní signalizace, která je obvyklá pro mnohobuněčné organizmy. Tato signalizace se vyznačuje produkcí signální molekuly do okolí a na tento signál reagují buňky v bezprostřední blízkosti producenta. Jako parakrinní signál u *B. subtilis* funguje produkováný surfaktin, který je syntetizován malým počtem buněk v populaci jako odpověď na přítomnost signální molekuly ComX (López *et al.* 2009c). Signální molekula ComX je součástí systému ComQXPA, který je zodpovědný za komunikaci mezi buňkami – quorum sensing. Protein ComQ funguje jako izoprenyl transferáza, připojuje izoprenylovou jednotku ke ComX signálnímu proteinu a aktivuje tak ComX. ComX slouží jako signální molekula pro dvoukomponentový systém ComP/ComA. ComP funguje jako histidin kináza, reagující autofosforylací na přítomnost ComX. Následně dochází k fosforylaci ComA odpovídajícího regulátoru, který pozitivně ovlivňuje přepis *srfA* operonu a tak i produkci surfaktinu (Dogsa *et al.* 2014). Producenti surfaktinu na surfaktin jako signální molekulu nereagují, na rozdíl od ostatních buněk, které jsou schopné surfaktin jako signál vnímat a stávají se z nich producenti extracelulární matrix. Zároveň se producenti extracelulární matrix nemohou stát producenty surfaktinu, protože nereagují na signální molekulu ComX, která je zadržována v exudátu na povrchu kolonií (López *et al.* 2009c).

Bakterie *B. subtilis* je schopná se v rámci kolonie či biofilmu diferencovat i do tzv. kanibalistických buněk. Vznik těchto buněk v populaci je opět indukován surfaktinem jako signální molekulou. Kanibalistické buňky produkují Skf (Sporulation killing factor) a Sdp (Sporulation delaying protein), které způsobují lyzi okolních buněk a živiny z nich uvolněné jsou následně využívány buňkami produkujícími extracelulární matrix a účinně tak oddalují sporulaci. Z lyzovaných buněk je do okolí uvolňována také DNA, která může být přijata kompetentními buňkami a může se tak zvyšovat genetická diverzita v bakteriální populaci. Kanibalismus je tak v rámci bakteriální populace výhodnou strategií, která umožňuje buňkám vyšší pravděpodobnost přežití a oddálit sporulaci za nepříznivých podmínek (López *et al.* 2009b).

Dráhy řídící produkci extracelulární matrix, kanibalismus nebo sporulaci jsou pod kontrolou společného regulačního proteinu Spo0A. Tento regulační protein je fosforylován pomocí kinázy KinA. Množství fosforylovaného Spo0A v okolí buněk má vliv na spuštění sporulace. Při nízkém množství fosforylovaného Spo0A proteinu jsou buňky diferencovány do producentů extracelulární matrix nebo kanibalistických buněk. Při nahromadění fosforylovaného proteinu Spo0A je spouštěn proces sporulace (Levine *et al.* 2012).

### 3.6 Potenciální využití surfaktinu

#### 3.6.1 Využití surfaktinu v lékařství

Snaha najít účinnou alternativu ke stávajícím léčivům nebo nalézt léčiva zcela nová obrátila pozornost k biosurfaktantům a jejich potenciálnímu využití v medicíně jakožto bezpečných a účinných terapeutických prostředků. U mnohých biosurfaktantů byla pozorována antibakteriální a antiadhezivní aktivita. Mezi tyto patří i surfaktin, který se mimo jiné vyznačuje i antifungálním, protivirovým a antimykoplazmatickým účinkem. Dále surfaktin vykazuje protinádorovou a trombolytickou aktivitu (Rodrigues *et al.* 2006).

Většina lipopeptidů produkovaných bakteriemi rodu *Bacillus*, mezi něž patří i surfaktin, působí velice dobře jako antimikrobiální agens. Byla u nich popsána antibakteriální aktivita vůči nebezpečným patogenům, z nichž některé patří mezi multirezistentní druhy bakterií způsobující nebezpečné nozokomiální nákazy. V porovnání s účinností konvenčních antibiotik jako je penicilin, byla u biosurfaktantů stanovena nejméně desetkrát nižší minimální inhibiční koncentrace (MIC). Biosurfaktanty v tomto případě byly schopny zamezit růstu bakterií jako je *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Alcaligenes faecalis*, *Serratia marcescens* a především methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (Das *et al.* 2008). Kromě toho je surfaktin schopen potlačit invazivní růst bakterií jako jsou *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* nebo *Proteus mirabilis*, dochází tak k inhibici tvorby biofilmu např. na vinylových uretrálních katetrech. Surfaktin je v tomto případě schopen inhibovat vznik biofilmu, ale není schopen úplně zamezit růstu těchto bakterií (Mireles *et al.* 2001).

Surfaktin se vyznačuje protivirovou aktivitou proti širokému spektru virů, jako jsou např. herpes simplex virus (HSV-1 a HSV-2), virus vezikulární stomatitidy, virus opičí imunodeficiency, kočičí kalicivirus a virus myši encefalomyokarditidy. Protivirová aktivita surfaktinu je mnohem účinnější při působení na obalené viry, zejména herpes viry a retroviry, než na viry, které obal postrádají. Pomocí elektronové mikroskopie bylo pozorováno narušení virové lipidové membrány surfaktinem (Vollenbroich *et al.* 1997a). Důležitým faktorem při inaktivaci virů je délka  $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny surfaktinu. Surfaktin s mastnou kyselinou o délce 13 uhlíků vykazuje mnohem nižší protivirovou aktivitu než surfaktin s délkou mastné kyseliny 15 uhlíků (Kracht *et al.* 1999).

Antimykoplazmatický účinek surfaktinu se využívá při ošetření buněčných linií lidských a zvířecích tkáňových kultur *in vitro*. Při dostatečně dlouhém působení surfaktinu

jsou ze savčích buněčných linií odstraněny všechny životaschopné zárodky mykoplazmat jako jsou *Mycoplasma orale* nebo *Mycoplasma hyorhinis* (Fehri *et al.* 2007; Hwang *et al.* 2008). Zároveň nebyla u surfaktinu pozorována cytotoxicita vůči savčím buňkám, naopak bylo pozorováno zlepšení rychlosti proliferace buněk v kultuře (Vollenbroich *et al.* 1997b).

Surfaktin také inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu rakovinných buněk např. lidského karcinomu prsu MCF-7. Účinkem surfaktinu dochází ke zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS, reaction oxygen species), které způsobují trvalou aktivaci ERK1/2 a JNK kináz. Tyto kinázy jsou klíčovými regulátory aktivujícími apoptózu buněk lidského karcinomu prsu (Cao *et al.* 2010). Dále je surfaktin schopen inhibovat proliferaci buněk karcinomu tlustého střeva pomocí indukce apoptózy a zastavení buněčného cyklu. Zástava buněčného cyklu a apoptóza jsou indukovány ERK kinázou a fosfoinositid 3-kináza/Akt (Kim *et al.* 2007).

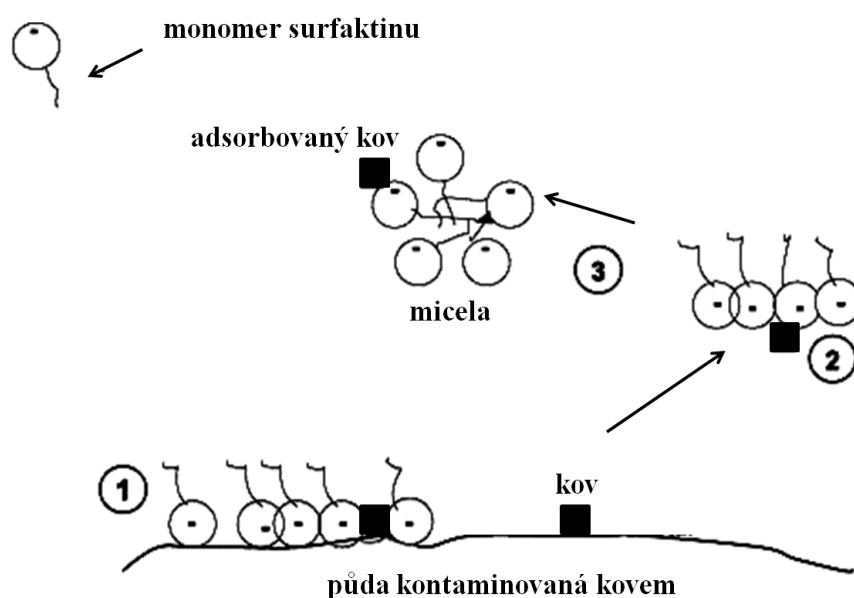
V poslední době se o surfaktinu uvažuje také jako o terapeutickém agens pro léčbu Alzheimerovy choroby a dalších neurodegenerativních poruch spojených se zánětem neuronů. Surfaktin dokáže výrazně snížit produkci prozánětlivých mediátorů jako jsou cytokiny, chemokiny, prostaglandin, oxid dusnatý, ROS a matrixové metaloproteázy. Exprese těchto mediátorů je vyvolána aktivací buněk mikroglií, jejichž aktivita je regulována ukládáním amyloidu  $\beta$  v mozku. Nadprodukce těchto neurotoxických prozánětlivých molekul přispívá k poškození neuronů a vzniku Alzheimerovi choroby. Surfaktin, který je schopen zmírnit produkci těchto zánětlivých a toxických faktorů, by se tak v budoucnu mohl stát jedním z možných léků na Alzheimerovu chorobu (Park *et al.* 2013b; Park *et al.* 2013a).

V neposlední řadě surfaktin vykazuje aktivitu působící proti některým parazitům, vyznačuje se tedy antiparazitickým účinkem. Surfaktin by mohl být alternativním lékem pro léčbu noseμόzy, což je onemocnění dospělých včel (*Apis mellifera*) způsobené parazitem *Nosema ceranae*. Po vystavení spor *Nosema ceranae* účinkům surfaktinu byla pozorována snížená schopnost infikovat dospělé jedince *Apis mellifera*. Dále byl prokázán snížený vývoj tohoto onemocnění po podání surfaktinu *ad libitum*, kdy se surfaktin dostává až do zažívacího traktu dospělých včel (Porrini *et al.* 2010).

### 3.6.2 Průmyslové využití surfaktinu

Výzkum v oblasti biosurfaktantů a jejich potenciálního využití v průmyslu se v poslední době stal velice zajímavým tématem. Biosurfaktanty jsou oproti chemickým detergentům snadno odbouratelné, méně toxické a šetrné k životnímu prostředí. Jsou používány jako penetrační činidla, flokulační, smáčecí a pěnící agens nebo adheziva (Cameotra & Makkar 2004; Nitschke & Costa 2007).

Nadějná oblast využití biosurfaktantů v průmyslu je použití při zvýšení výtěžků při těžbě ropy, čištění odpadní vody nebo zvýšení rozpustnosti hydrofobních nežádoucích složek, ale také při biodegradacích (Mulligan 2005). Surfaktanty byly testovány při degradaci ropného znečištění především v půdě. Při porovnání rhamnolipidů a surfaktinu jako biologických surfaktantů se syntetickými surfaktanty Tween 80 a Triton X-100, měly rhamnolipidy a surfaktin mnohem vyšší schopnost odstranění ropného znečištění z půdy (Lai *et al.* 2009). Kromě toho je při použití surfaktinu možné z půdy odstranit velkou část kontaminace v podobě těžkých kovů jako jsou měď, zinek nebo kadmium (Obr. 8), zatímco při použití rhamnolipidů byla z prostředí odstraněna necelá třetina těchto přítomných kovů (Mulligan 2005).



**Obr. 8** Předpokládaný mechanismus odstraňování těžkých kovů z půdy pomocí surfaktinu.

- 1) Akumulace micel na povrchu kontaminované půdy
- 2) Vyvázání kovu z půdy pomocí snížení povrchového napětí a elektrostatických sil
- 3) Zabudování kovu do micely

Upraveno podle Mulligan (2005).

Biosurfaktanty vykazují kromě použití v těžkém průmyslu také vysoký potenciál použití v potravinářském průmyslu. Přispívají k tomu především stabilizační, antiadhezivní a antimikrobiální účinky těchto látek. Kromě toho roste zájem o nahrazení umělých chemicky syntetizovaných konzervantů látkami přírodními jako jsou biosurfaktanty (Nitschke & Costa 2007). Cílem je tedy připravit produkty bezpečné pro konzumenta. Velice nežádoucí v potravinářství jsou kontaminace patogenními bakteriemi *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* a *Enterobacter sakazakii*. Tyto bakterie mohou ulpívat na povrchu materiálů a tvořit zde biofilmy a odolávat tak dezinfekčním postupům. Surfactin významně inhibuje adhezi bakterií *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* i *E. sakazakii*, tím dochází k významnému snížení životaschopnosti buněk. Pro srovnání rhamnolipidy naopak stabilizují *L. monocytogenes* na povrchu a zvyšují tak adhezi rostoucích buněk a jejich vitalitu (Nitschke *et al.* 2009).

Zvýšení produktivity zemědělství a stále rostoucí poptávka a nároky na produkci, tlačí kupředu i vývoj ekologicky přijatelných pesticidů, kterými by se mohly stát biosurfaktanty. V zemědělství lze biosurfaktanty využít pro eliminaci patogenů nebo zvýšení dostupnosti živin (Sachdev & Cameotra 2013). Byl popsán pozitivní účinek směsi surfaktinu a mykosubtilinu na ochranu vinné révy proti napadení plísní *Botrytis cinerea* (Farace *et al.* 2014). Další problémovou plísní je *Colletotrichum gloeosporioides*, která snižuje kvalitu a produkci plodin po celém světě. Napadá především plody, jako jsou pepř, mango nebo borůvky. Rostliny mohou být před touto plísní chráněny společným působením surfaktinu a dalšího lipopeptidu iturinu (Kim *et al.* 2010). Kromě toho mohou být biosurfaktanty používány v zemědělství pro zlepšení kvality zemědělské půdy např. odstraňováním těžkých kovů (Sachdev & Cameotra 2013).

## 4 MATERIÁL A METODY

### MATERIÁL

#### 4.1 Bakteriální kmeny

Diplomová práce byla vypracovávána na bakterii *Bacillus subtilis* 168 trp<sub>2</sub> ze sbírky Bacillus Genetic Stock Center. Pro produkci a izolaci surfaktinu byl používán *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (American Type Culture Collection).

Bakteriální kmeny byly uchovávány v podobě sporových konzerv (v 15% glycerolu) při teplotě -20 °C. Před použitím byl kmen *B. subtilis* 168 zaočkován do dvou po sobě jdoucích pasáží na šikmém agaru (živný agar Oxoid, 30 °C, 16 h). Kmen *B. subtilis* ATCC 21332 byl zaočkován nejdříve do první pasáže na šikmém agaru (živný agar Oxoid, 30 °C, 16 h) a následně do druhé pasáže v tekutém médiu (minerální médium dle Coopera, 30 °C, 24 h). Šikmé agary byly uchovávány při teplotě 4 °C po maximální dobu 14 dnů. Před samotným pokusem byl daný kmen zaočkován do tekutého média a kultivován přes noc po dobu 16 hodin v horkovzdušné třepačce při 30 °C a frekvenci rotace 150 rpm (rounds per minute).

#### 4.2 Kultivační půdy

##### 4.2.1 Živný bujón Oxoid

Lab-Lemco powder.....	1,0 g
Bacto yeast extract.....	2,0 g
Bactopepton.....	5,0 g
NaCl.....	5,0 g

Všechny uvedené složky byly nejprve smíchány a rozpuštěny v dostatečném množství destilované vody. Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu pH 7,0 pomocí 1M KOH. Posléze byl objem doplněn destilovanou vodou do objemu 1000 ml a médium bylo sterilizováno v autoklávu.

#### 4.2.2 Minerální médium dle Coopera

<b>A:</b>	Glukosa .....	40,0 g
<b>B:</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	30 mM
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	50 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	40 mM
<b>C:</b>	MgSO <sub>4</sub> .....	0,8 mM
<b>D:</b>	FeSO <sub>4</sub> .....	1 mM
<b>E:</b>	CaCl <sub>2</sub> .....	7 μM
<b>F:</b>	Na <sub>2</sub> EDTA .....	4 μM

Jednotlivé složky média A, B, C, D, E a F byly nejprve rozpuštěny v přiměřeném množství vody a každá ze složek byla následně sterilizována v autoklávu. Ve složce B bylo před sterilizací upraveno pH na hodnotu pH 7,0 pomocí 1M KOH. Roztok FeSO<sub>4</sub>, složka C, byl před použitím sterilizován filtrací (filtry Milliex<sup>®</sup> GS Millipore, velikost pórů 0,22 μm). Po sterilizaci a vychladnutí připravených roztoků byly jednotlivé složky asepticky slity dohromady a doplněny sterilní destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

#### 4.2.3 Minerální médium dle Coopera s přidavkem aktivního uhlí

<b>A:</b>	Glukosa .....	40,0 g
<b>B:</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	30 mM
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	50 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	30 mM
<b>C:</b>	MgSO <sub>4</sub> .....	0,8 mM
<b>D:</b>	FeSO <sub>4</sub> .....	2 mM
<b>E:</b>	CaCl <sub>2</sub> .....	7 μM
<b>F:</b>	Na <sub>2</sub> EDTA .....	4 μM
<b>G:</b>	aktivní uhlí .....	25 g

Jednotlivé složky média A, B, C, D, E a F byly připraveny stejným způsobem jako v kapitole 4.2.2 a po sterilizaci a vychladnutí byly jednotlivé složky asepticky slity



dohromady a doplněny sterilní destilovanou vodou do objemu 1000 ml. Aktivní uhlí, složka G, bylo sterilizováno samostatně v autoklávu.

#### 4.2.4 Minerální médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů

<b>A:</b>	Glukosa .....	40,0 g
<b>B:</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	30 mM
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	50 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	40 mM
<b>C:</b>	MgSO <sub>4</sub> .....	7 μM
<b>D:</b>	FeSO <sub>4</sub> .....	5 mM
<b>E:</b>	CaCl <sub>2</sub> .....	7 μM
<b>F:</b>	Na <sub>2</sub> EDTA .....	4 μM

Jednotlivé složky média A, B, C, D, E a F byly připraveny stejným způsobem jako v kapitole 4.2.2 a po sterilizaci a vychladnutí byly jednotlivé složky asepticky slity dohromady a doplněny sterilní destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

### 4.3 Pevné půdy

#### 4.3.1 Šikmý agar

Živný agar (Oxoid) ..... 28 g

Navážka byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody. Následně rozplněna po 8 ml do zkumavek a sterilizována. Poté byly zkumavky uloženy v šikmé poloze až do zatuhnutí.

#### 4.3.2 Živný agar se surfaktinem

Agarové plotny se surfaktinem byly připraveny vždy čerstvé v den pokusu. Sterilní médium (28 g do 1000 ml, Oxoid) bylo ochlazeno na 70 °C a následně byl sterilně přidán surfaktin rozpuštěný v metanolu v množství odpovídající požadované výsledné koncentraci v médiu. Před nanáškou surfaktinu byl přírůstek surfaktinu nejprve zředěn dvojnásobným objemem metanolu, abych se zamezilo vysrážení surfaktinu ve vodném prostředí. Poté byl

agar po intenzivním míchání rozplněn do Petriho misek o průměru 5,3 cm po 3,5 ml, resp. do misek o průměru 8,3 cm po 8,6 ml. Petriho misky byly ihned po naplnění přeneseny do horkovzdušné sušárny předehřáté na 70 °C, kde byly ponechány 75 min, aby došlo k odpaření metanolu. Po vyndání misek a jejich zatuhnutí, byly plotny umístěny do sterilního očkovacího UV boxu, kde prouděním vzduchu po dobu 30 min došlo k odpaření přebytečné vlhkosti na povrchu pevné půdy.

#### 4.3.3 Sporulační agar

<b>A:</b>	Živný agar (Difco) .....	23 g
	NaCl .....	18 μM
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	1 μM
<b>B:</b>	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O .....	1 μM
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O .....	10 μM
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O .....	1 M

Navážky složky A byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody a sterilizovány. Po sterilizaci byla složka A ochlazena na teplotu 45 – 50 °C a k ní byl přidán 1 ml sterilní složky B o stejné teplotě. Složka B se sterilizovala filtrací (filtry Milliex<sup>®</sup> GS Millipore, velikost pórů 0,22 μm). Následně byl agar zamíchán a sterilně rozlit do Petriho misek.

## METODY

### 4.4 Sterilizace

Kultivační média, vodné roztoky a aktivní uhlí byly sterilizovány 20 minut při 121 °C v autoklávu, při přetlaku vodní páry 0,15 MPa. Roztok  $\text{FeSO}_4$  a složka B sporulačního agaru byly před použitím sterilizovány filtrací pomocí membránových filtrů (filtry Milliex<sup>®</sup> GS Millipore, velikost pórů 0,22  $\mu\text{m}$ ). Laboratorní sklo bylo sterilizováno v horkovzdušné sušárně při 180 °C po dobu 1 hodiny, případně při 130 °C po dobu 3 hodin.

### 4.5 Příprava sporových konzerv

Tekutá kultura v exponenciální fázi růstu ( $\text{OD}_{420} = 0,500$ ) kultivovaná v komplexním médiu (živný bujón, Oxoid) byla zaočkována na 20 Petriho misek se sporulačním agarem (kapitola 4.3.3). Misky byly poté umístěny do termostatu dnem vzhůru a inkubovány 4 dny při teplotě 40 °C.

Po uplynutí inkubační doby, byly v optickém mikroskopu pozorovány světlolomné spory. Biomasa na Petriho miskách byla sterilně omyta a resuspendována 3 ml sterilní destilované vody. Vzniklá suspenze byla převedena do sterilních plastových centrifugačních zkumavek Falcon o objemu 50 ml, centrifugována (centrifuga Rotina 380R, Hettich, 10 min, 5000 rpm) a pelet byl 3krát promyt 30 ml sterilní destilované vody. Po posledním promytí byl supernatant odstraněn a sediment byl resuspendován v malém množství sterilní destilované vody a přenesen do jedné centrifugační zkumavky a sedimentován 15 min při 5000 rpm. Sediment byl poté resuspendován v 15 ml 15% glycerolu a rozplněn po 0,1 ml do sterilních plastových mikrozkušavek Eppendorf a uchováván při -20 °C.

Před samotným použitím byla konzerva rozmrazena, důkladně promíchána a sterilní bakteriologickou kličkou zaočkována na šikmý agar (kapitola 4.3.1). Šikmý agar byl poté inkubován 16 h při 30 °C a uchováván maximálně 14 dní při 4 °C.

## 4.6 Kultivace bakterií a růstová křivka

### 4.6.1 Růst *B. subtilis* v tekutém médiu

Sporová konzerva (kapitola 4.5) byla před každým pokusem aktivována pomocí dvou po sobě jdoucích pasáží na šikmých agarech. Před samotným pokusem byla odebrána sterilně biomasa z šikmého agaru a zaočkována do 30 ml komplexního média (kapitola 4.2.1) a bakterie byly aerobně kultivovány v Erlenmayerových baňkách v horkovzdušné třepačce (NB-205, N-BIOTEK) vytemperované na teplotu 30 °C po dobu 16 hodin (noční inokulum). Dostatečné vzdušnění bylo zajištěno třepáním rychlostí 150 rpm. Po 16 hodinách bylo inokulum přeočkováno do další tekuté pasáže (ranní inokulum) dokud nedosáhlo střední exponenciální fáze růstu ( $OD_{420} = 0,500$ ). Takto narostlá kultura byla přeočkována do dalších 3 paralelních baněk (růst), které byly použity pro vlastní pokus (Obr. 9). Optická denzita inokula byla měřena na spektrofotometru Beckman Coulter DU 730 (10 mm kyvety) při vlnové délce 420 nm v pravidelných časových intervalech o délce 40 min (ranní inokulum), resp. 30 min (další růst). Jako slepý vzorek pro měření byla použita destilovaná voda.

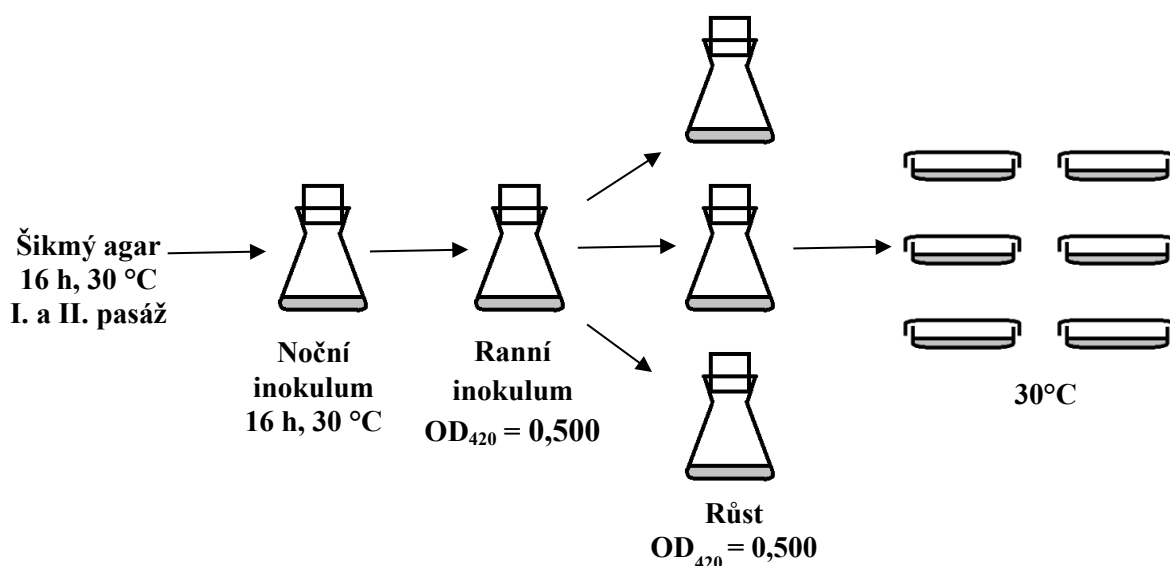
### 4.6.2 Růst *B. subtilis* na pevné půdě

#### Použité roztoky

- Fyziologický roztok – 0,85% roztok NaCl

Bakteriální kultura popsaná v kapitole 4.6.1 byla po nárůstu do optické denzity  $OD_{420} = 0,500$  vysévána na čerstvé agarové plotny (Obr. 9). Pro velikost ploten o průměru 5,3 cm bylo použito 0,2 ml inokula a pro velikost misek o průměru 8,3 cm 0,49 ml. Objemy nanášené bakteriální suspenze odpovídají v obou případech velikosti inokula  $10^7$  buněk. Následně byly misky umístěny dnem vzhůru do termostatu vytemperovaného na 30 °C a v intervalech 60 min byly omyty vždy dvě paralelní misky 2 ml (misky o průměru 5,3 cm), resp. 4,9 ml (misky o průměru 8,3 cm) fyziologického roztoku. Omytá biomasa byla důkladně resuspendována a za účelem měření optické denzity ředěna destilovanou vodou. Naměřené hodnoty byly opět vynášeny do grafu,  $\log_2 (OD_{420} \cdot 1000)$  v závislosti na čase.

Podle stejného schématu probíhala i izolace bakteriálních buněk vystavených účinku surfaktinu. Kultivace v tomto případě pak probíhala z důvodu vyšší výtěžnosti bakteriální biomasy vždy jen na miskách o průměru 8,3 cm.



**Obr. 9** Schéma kultivace

#### 4.7 Stanovení počtu buněk výsevem na plotny

Počet buněk v kultuře byl stanoven výsevem suspenze bakterií na agarové plotny a následným spočítáním narostlých kolonií po inkubaci v termostatu při 30 °C. Výsledek byl vyjádřen jako hodnota CFU/ml (colony forming unit, CFU).

Exponenciálně rostoucí kultura bakterií o optické densitě  $OD_{420} = 0,500$  byla ředěna sterilním fyziologickým roztokem na výsledná ředění  $10^{-4}$ ,  $\frac{1}{2} \cdot 10^{-4}$  a  $10^{-5}$  a vyseta v objemu 0,1 ml na agarové plotny vždy ve třech paralelách. Petriho misky byly poté inkubovány dnem vzhůru 16 hodin při 30 °C. Po uplynutí inkubační doby byly na všech třech paralelních plotnách daného ředění spočítány narostlé kolonie. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a přepočítány na počet vegetativních buněk v 1 ml původní kultury.

#### 4.8 Kapkový test

Použité roztoky:

- Fyziologický roztok – 0,85% NaCl

Stanovení inhibiční koncentrace surfaktinu pomocí kapkového testu probíhalo na čtvercových Petriho miskách. Tyto misky jsou rozděleny na 25 stejných dílů o ploše 4 cm<sup>2</sup>. Agarová půda v těchto miskách byla asepticky připravována na vodní lázni o teplotě 50 °C, do každé jamky bylo nanášeno 0,85 ml sterilního agaru a poté byly misky přeneseny do

horkovzdušné sušárny předehřáté na 70 °C. Zde byly ponechány 75 min, aby došlo k odpaření metanolu, ve kterém je surfaktin rozpouštěn. Po vytažení misek a zatuhnutí agaru byla přebytečná vlhkost na povrchu agaru ponechána odpařit při proudění vzduchu ve sterilním očkovacím UV boxu po dobu 30 min. Agarové půdy se surfaktinem byly připravovány vždy čerstvé v den pokusu.

Exponenciálně rostoucí kultura *B. subtilis* 168 o optické denzitě  $OD_{420} = 0,500$  byla ředěna sterilním fyziologickým roztokem na konečnou velikost inokula  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  a  $10^4$  buněk/10  $\mu$ l. Kapičky o objemu 10  $\mu$ l se suspenzí buněk byly opatrně nanášeny na povrch agaru. Po zaschnutí kapky inokula byly agarové plotny umístěny na 14 hodin do termostatu vytemperovaného na 30 °C. Po uplynutí inkubační doby byl každý agarový díl omyt fyziologickým roztokem o objemu 0,5 ml. Biomasa byla řádně resuspendována a změřena její optická denzita. Následně byl porovnáván rozdíl nárůstů buněk na agarových plotnách s danou koncentrací surfaktinu vzhledem ke kontrole bez surfaktinu a v závislosti na velikosti naneseného inokula.

#### 4.9 Izolace surfaktinu

##### Použitý materiál a roztoky:

- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- Filtry Whatman GF/C o průměru 25 mm
- Kyselina chlorovodíková (HCl), (Lachema)

Surfaktin byl izolován podle modifikované metody popsané v publikaci Symmank *et al.* (2002). K izolaci bylo použito minerální média dle Coopera (kapitola 4.2.2). Tekutá bakteriální kultura o objemu 2000 ml byla inkubována po dobu 72 hodin při teplotě 30 °C a 120 rpm na horkovzdušné třepačce Gallenkamp. Po ukončení kultivace byly buňky centrifugací odděleny od média (centrifuga Rotina 380R, 8000 g, 15 min, 4 °C). pH média bylo upraveno na hodnotu pH 2 pomocí koncentrované HCl. Následná precipitace probíhala přes noc při teplotě 4 °C. Získaný precipitát byl druhý den centrifugován (centrifuga Rotina 380R, 8000 g, 15 min, 4 °C), supernatant byl odstraněn a sediment byl extrahován v 1000 ml metanolu. Extrakce probíhala za intenzivního míchání při laboratorní teplotě po dobu 2 hodin. Následně byl extrakt přefiltrován přes filtrační aparaturu Whatman (filtry GF/C o průměru 25 mm) a metanol byl odpařen na rotační vakuové odparce (RVO 400, INGOS) na vodní lázni o teplotě 40 °C. Suchý produkt byl rozpuštěn ve 200 ml chloroformu a opět přefiltrován

přes filtrační aparaturu Whattman (filtry GF/C o průměru 25 mm). Chloroform byl následně odpařen na rotační vakuové odparce za stejných podmínek jako metanol. Po odpaření chloroformu zůstal na stěnách odpařovací baňky krystalický izolát surfaktinu žlutohnědé barvy, který byl rozpuštěn v čistém metanolu a uchováván v chladu při teplotě 4 °C.

#### 4.10 Stanovení koncentrace surfaktinu (LC/MS)

##### Použité chemikálie:

- Surfaktin (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)

Koncentrace surfaktinu v metanolvém izolátu byla stanovována pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), k detekci látky vycházející z kolony byla použita metoda hmotnostní spektrometrie (LC/MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Na základě získaných hmotnostních spekter vybraných  $m/z$  (hmotnost/náboj,  $m/z$ ) byla možná identifikace látky a stanovení jejího celkového zastoupení.

Pro analýzu byl použit systém HPLC Agilent 1200 s kolonou Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) o délce 150 mm, s vnitřním průměrem 4,6 mm a velikostí částí 5  $\mu$ m. K izokratické eluci byla použita mobilní fáze acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí:voda + 0,1% kyselina mravenčí v poměru 80 %:20 %. Objem nástřiku vzorku do kolony byl 5  $\mu$ l. Průtoková rychlost kolonou byla nastavena na rychlost 1 ml/min. Analýza probíhala v režimu SIM (Selected Ion Measurement). Při měření byly detekovány ionty  $m/z$  a  $m/z$  + Na (adukt sodíku): 994,6 a 1016,6; 1008,6 a 1030,6; 1022,6 a 1044,6; 1036,6 a 1058,6; 1050,6 a 1072,6 (izoformy surfaktinu s délkou řetězce mastné kyseliny o C-12, C-13, C-14, C-15 a C-16 uhlících). Jako standard byl použit čistý surfaktin rozpuštěný v metanolu. Ke zpracování záznamů byly použity programy Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition a Agilent MassHunter Data Analyses.

Měření probíhala na Katedře analytické chemie PřF UK v Praze pod vedením Mgr. Petra Kozlíka.

#### 4.11 Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro *B. subtilis* 168

Stanovení inhibičního účinku surfaktinu bylo prováděno na pevné půdě, a to z důvodu srážení surfaktinu v tekutém médiu (Stružinská 2010). Exponenciálně rostoucí bakteriální kultura o velikosti inokula  $10^7$  buněk byla vysévána na čerstvé agarové plotny obsahující různé koncentrace surfaktinu. Misky byly následně inkubovány 14 hodin v termostatu při 30 °C. Po uplynutí kultivační doby byla biomasa smývána z povrchu agarových ploten 2 ml (misky o průměru 5,3 cm), resp. 4,9 ml (misky o průměru 8,3 cm) fyziologického roztoku. Suspenze buněk byla řádně resuspendována, zředěna destilovanou vodou a změřena její optická denzita. Porovnáním nárůstů buněk na miskách s různými koncentracemi surfaktinu s nárůsty buněk na kontrolních miskách bez surfaktinu byly vybrány dvě různé subletální koncentrace surfaktinu.

#### 4.12 Izolace a analýza lipidové frakce cytoplazmatických membrán

K izolaci lipidové frakce byla použita biomasa získaná omytím narostlých buněk na agarových plotnách. Byla použita metoda popsaná v publikaci Radin (1981). Některé kroky byly modifikovány a upraveny pro izolaci lipidové frakce z bakteriálních buněk.

##### 4.12.1 Izolace lipidové frakce

Použitý materiál a roztoky:

- Hexan-izopropanol (Fluka) 3:2 (v/v)
- Chloroform (Fluka)
- Filtry Whatman GF/C o průměru 25 mm

Suspenze buněk získaná omytím z povrchu agarových ploten vychlazeným fyziologickým roztokem byla centrifugována (centrifuga Rotina 380R, 8000 g, 15 min, 4 °C) a následně dvakrát promyta čistým fyziologickým roztokem. Během promývání byly buňky převedeny z centrifugačních zkumavek Falcon do teflonových centrifugačních zkumavek Oak Ridge. Po finálním odstranění supernatantu byly buňky důkladně resuspendovány ve vychlazené extrakční směsi hexan-izopropanolu v poměru 3:2 (v/v). Objem extrakční směsi byl přidáván v poměru 10 ml/ $6 \cdot 10^8$  buněk. Následná extrakce lipidové frakce probíhala přes noc při 4 °C.

Lipidový extrakt byl od sedimentu oddělen centrifugací (centrifuga Rotina 380R, 5000 g, 10 min, 4 °C) a přenesen do čistých odpařovacích baněk. Baňky byly před použitím



vymyty extrakčním roztokem, resp. chloroformem. Zbylý sediment byl ještě jednou reextrahován 5 ml extrakční směsí, znovu centrifugován a extrakt následně přidán do odpařovacích baněk. Extrakt lipidů rozpuštěný ve směsi rozpouštědel byl odpařován na rotační vakuové odparce na vodní lázni o teplotě 38 °C. Po odpaření směsi hexan-izopropanolu zůstal na stěnách baňky viditelný film, který byl rozpuštěn v 5 ml chloroformu a přefiltrován přes skleněnou filtrační aparaturu Whattman (filtry GF/C o průměru 25 mm). Nerozpustný sediment zachycený na filtru byl ještě promyt dalšími 5 ml chloroformu a spojen s předešlým filtrátem.

Chloroform byl opět odpařen na rotační vakuové odparce na vodní lázni o teplotě 38 °C. Suchá lipidová frakce byla rozpuštěna v 1 ml chloroformu a převedena do skleněných lahviček s teflonovým septem. Odpařovací baňka byla ještě promyta 0,5 ml čistého chloroformu, který byl přidán k extraktu ve skleněných lahvičkách. Chloroform byl poté odpařen pod proudem dusíku. Získaná čistá lipidová frakce byla použita pro analýzu zastoupení polárních hlav a mastných kyselin fosfolipidů a pro stanovení ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH zabudované do váčků vytvořených z izolovaných lipidů. Suchá lipidová frakce byla do doby jejího použití uchovávána při teplotě -80 °C.

#### **4.12.2 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)**

Zastoupení polárních hlav fosfolipidů ve vzorku izolovaných lipidů bylo analyzováno pomocí metody tenkovrstevné chromatografie (Thin Layer Chromatography, TLC). Vrstva silikagelu tloušťky 0,5 mm byla použita jako stacionární fáze a jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel o různé polaritě (chloroform-metanol-voda, 65:25:4, v/v/v)

##### **4.12.2.1 Příprava chromatografických desek**

Použitý materiál a roztoky:

- Skleněné desky se silikagelem 60 (Merck)
- Mobilní fáze: chloroform-metanol-voda, 65:25:4 (v/v/v)
- 1,8% kyselina boritá (Penta) rozpuštěná v etanolu

K analýze lipidových extraktů byly použity preparativní TLC desky se silikagelem 60 (Merck) naneseným na skleněné desce o rozměrech 20 x 20, kdy vrstva silikagelu dosahovala tloušťky 0,5 mm. Před samotným nanesením lipidů byla deska promyta v chromatografické komoře nasycené parami mobilní fáze (chloroform:metanol:voda, 65:25:4, v/v/v), aby došlo

k odstranění případných nečistot z výroby. Po vytažení a vyprchání rozpouštědel byla deska postříkána 1,8% roztokem kyseliny borité a následně aktivována při 110 °C po dobu 60 minut. Poté byla ihned umístěna do exsikátoru až do jejího vychladnutí.

#### **4.12.2.2 Jednorozměrná chromatografie na tenké vrstvě**

Použitý materiál a roztoky:

- Mobilní fáze: chloroform-metanol-voda, 65:25:4 (v/v/v)
- Směs: chloroform-metanol, 2:1 (v/v)
- Jód (Lachema)
- 0,2% roztok ninhydrinu (Lachema) ve směsi butanol-kyselina octová (95:5, v/v)

Mobilní fáze chloroform-metanol-voda, 65:25:4 (v/v/v) byla namíchána a nalita do chromatografické komory s dostatečným předstihem (min. 1 hod), aby došlo k prosycení komory parami směsi. Aktivovaná deska byla z exsikátoru vyjmuta až těsně před samotným nanesením vzorků, ty byly nejprve rozpuštěny v 80 µl směsi chloroform-metanol 2:1 (v/v) a pomocí stříkačky Hamilton naneseny do bodu na vymezeném startu desky. Po nanesení všech vzorků byla deska vložena do komory s mobilní fází. Během 70 – 80 minut dosáhla dělicí směs čela, deska byla vyjmuta z chromatografické komory a umístěna do digestoře, aby oschla. Během uvedených 70 - 80 minut došlo na dráze o délce 16 cm k rozdělení lipidového extraktu na jednotlivé fosfolipidové třídy.

Jednotlivé fosfolipidové třídy byly detekovány parami jódu, který reaguje s lipofilními látkami za vzniku žlutohnědého zbarvení. Po uvolnění jódu z desky byla postříkána 0,2% roztokem ninhydrinu a umístěna do vyhřáté horkovzdušné sušárny na 30 minut při teplotě 105 °C. Došlo k vytvoření růžového zbarvení v místě výskytu aminoskupiny, čímž byly detekovány polární hlavičky fosfolipidů obsahující aminoskupinu ve své molekule.

#### **4.12.3 Kvantitativní stanovení lipidického fosfátu**

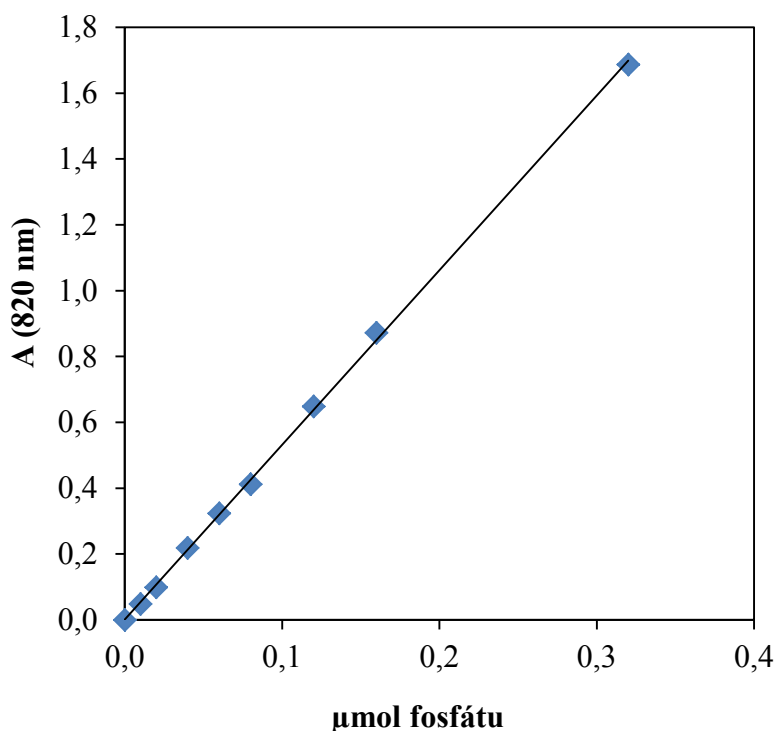
Použitý materiál a roztoky:

- Koncentrovaná kyselina chloristá ( $\text{HClO}_4$ ) (Penta)
- 2,5% (w/v) molybdenan amonný (Lach-Ner)
- 10% (w/v) kyselina askorbová (Lach-Ner)
- Standard anorganického fosfátu – 0,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Roth)

Ke stanovení lipidického fosfátu byla použita metoda dle Rouser *et al.* (1970). Do čistých skleněných zkumavek, které byly před použitím pětkrát vypláchnuty tekoucí vodou, následně dvakrát vypláchnuty destilovanou vodou a vysušeny v horkovzdušné sušárně, byl kvantitativně převeden silikagel obsahující jednotlivé fosfolipidové třídy. Silikagel byl poté převrstven 0,5 ml koncentrované  $\text{HClO}_4$  (70%) a inkubován při 180 °C v mineralizačním bloku po dobu 20 min. Po zchlazení bylo ke vzorkům přidáno 3,5 ml deionizované vody a 0,5 ml 2,5% (w/v) molybdenanu amonného. Směs byla důkladně promíchána a následně bylo přidáno ještě 0,5 ml 10% (w/v) kyseliny askorbové, následovalo opět důkladné promíchání. Poté byly vzorky vloženy do vodní lázně a zahřívány po dobu 5 min při 100 °C. Po vytažení z lázně byly vzorky ponechány do druhého dne, aby silikagel sedimentoval.

Absorbance vzniklého modrého zabarvení (fosfomolybdenová modř) byla měřena při vlnové délce 820 nm na spektrofotometru Beckman Coulter DU 730 (10 mm kyvety). Jako slepý vzorek byla používána reakční směs s čistým silikagelem. Pro přesné určení fosfátu ve vzorcích byla sestavena kalibrační přímka (Obr. 10) standardu 0,2 mM zásobního roztoku fosfátu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ). Postup zpracování vzorků standardů byl stejný jako u vzorků se silikagelem s rozdílem vynechání mineralizačního kroku. Přepočtem z rovnice kalibrační přímky byl stanoven skutečný obsah anorganického fosfátu v jednotlivých vzorcích. Celkové množství fosfátu přítomné ve všech skvrnách bylo stanoveno jako 100 % a z tohoto celku byla určena jednotlivá procentuální zastoupení fosfolipidových tříd.

Kalibrační přímka:



**Obr. 10** Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci fosfátu

#### **4.12.4 Plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)**

Analýza mastných kyselin lipidů izolovaných metodou popsanou v kapitole 4.12.1 byla prováděna pomocí plynové chromatografie (Gas Chromatography, GC) spojené s hmotnostní spektrometrií (Mass Spectrometry, MS). Tato měření probíhala s použitím přístrojového vybavení Katedry analytické chemie PřF UK v Praze.

##### **4.12.4.1 Derivatizace mastných kyselin**

Použitý materiál a roztoky:

- Derivatizační roztok – 5,4 g  $\text{CH}_3\text{ONa}$  (Fluka) - ve směsi 60 ml bezvodého metanolu se 40 ml benzenu (Lach-Ner) a 15 mg fenolftaleinu
- Bezvodá  $\text{HCl}$  – 14,2 ml  $\text{CHOC}$ l přikapáván opatrně do metanolu, doplněno do 100 ml metanolem ( $\text{CH}_3\text{OH} + \text{CHOC}$ l  $\rightarrow$   $\text{CH}_3\text{COOH} + \text{HCl}$ )
- Methylchlorokarbonát ( $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$ ) (Sigma-Aldrich)
- Pentan (Sigma-Aldrich)
- Heptan (Fluka)

Ke vzorku čistých fosfolipidů bylo přidáno 0,2 ml derivatizačního roztoku, který byl ponechán působit 5 minut. Poté byl roztok zneutralizován přidáním bezvodé HCl. Následně bylo ke vzorku přidáno 10 µl methylchlorokarbonátu a reakční směs byla ponechána 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla směs třikrát extrahována 0,2 ml pentanu. Organické extrakty pentanu byly spojeny a odpařeny pod proudem dusíku. Vzniklé methylestery mastných kyselin byly před měřením rozpuštěny v 0,1 ml heptanu.

#### **4.12.4.2 Analýza methylesterů mastných kyselin**

K měření byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC 17A – QP5050 s autosamplerm AOC i20 a kapilární kolonou DB35 (32 m x 0,25 mm, s tloušťkou filmu 1 µm). Nosným plynem bylo helium (78,8 kPa, průtoková rychlost 1 ml/min).

Teplotní program byl nastaven na počáteční izotermu 60 °C 4 min, s postupným nárůstem teploty 7,5 °C/min až na konečnou izotermu 250 °C po dobu 20 minut. Velikost nástřiku vzorku byla 2 µl a snímáno bylo rozmezí m/z 35 – 550. Methylestery mastných kyselin procházejí kolonou za těchto podmínek v časovém rozmezí 14 – 21 minut. Měřená data byla zaznamenávána a zpracovávána počítačovým programem GC-MS Solution 2.30 (Shimadzu, Japan). Součet ploch peaků jednotlivých methylesterů mastných kyselin byl 100 %.

#### **4.12.5 Izolace cytoplazmatickým membrán**

##### Použitý materiál a roztoky:

- Fyziologický roztok – 0,85% NaCl
- Roztok A: 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Roth)
- Roztok B: 0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fluka)
- Buněčný pufr: 50 mM fosfátový pufr; pH 8,0 (94,7 ml A + 5,3 ml B, doplnit do 400 ml destilovanou vodou)
- Membránový pufr: 100 mM fosfátový pufr; pH 6,6 (37,5 ml A + 62,5 ml B, doplnit do 200 ml destilovanou vodou)
- 150 mM K<sup>+</sup> - EDTA (Sigma)
- 500 mM MgSO<sub>4</sub> (Penta)
- 100 mM phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Serva) v izopropanolu
- 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), pH 6,6
- DNáza I (Sigma): 1 mg DNázy I v 1 ml 50% glycerolu (w/v) obsahující 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 1 mM MgCl<sub>2</sub>, uchováno v -20 °C

- Roztok TRN (Sigma): 1% RNáza (w/v), 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl (w/v), 15 minut při 100 °C, uchovano v -20 °C
- Lysozym (Serva, 100 000 U/mg)

K izolaci membránové frakce z bakterií rostoucích na pevných agarových plotnách bez přídavku a s přídavkem surfaktinu při teplotě 30 °C byla použita enzymatická metoda (Bisschop & Konings 1976).

Biomasa bakterií byla omyta s povrchu pevného média vychlazeným fyziologickým roztokem, suspenze byla převedena do centrifugačních zkumavek Falcon a centrifugována (centrifuga Rotina 380R, 8000 g, 15 min, 4 °C). Biomasa byla dvakrát promyta fyziologickým roztokem a poté přímo použita pro izolaci cytoplazmatických membrán nebo zamražena v tekutém dusíku. Do doby jejího zpracování byla uchovávána v -80 °C.

Při izolaci cytoplazmatických membrán byla nejdříve biomasa buněk řádně resuspendována v 10 ml buněčného pufru, s přídavkem lysozymu v koncentraci 300 µg/ml a s přídavkem 50 µl phenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF). Následně byl ke směsi přidán roztok DNázy I v objemu 10 µl a roztok RNázy také v objemu 10 µl, suspenze byla řádně promíchána. Na závěr byl k suspenzi přidán 50 mM MgSO<sub>4</sub>, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 10 mM. Následovala inkubace 30 minut při teplotě 30 °C, po uplynutí této doby byl proces lyze ukončen přidáním K<sup>+</sup>-EDTA na konečnou koncentraci 15 mM a po uběhnutí 1 minuty byl znovu přidán MgSO<sub>4</sub>, aby bylo opět dosaženo konečné koncentrace 10 mM.

Suspenze lyzovaných buněk byla rozplněna do centrifugačních mikrozkušavek Eppendorf a centrifugována (centrifuga Mikro 220R, Hettich) při 25 000 g a 4 °C po dobu 25 min. Sediment byl ještě třikrát promyt 1 ml Tris-HCl, aby došlo k odstranění fosfátu z buněčného pufru. Získaný sediment membrán byl resuspendován ve 150 µl Tris-HCl pufru a rozplněn po 50 µl do plastových mikrozkušavek Eppendorf, které byly následně umístěny do hlubokomrazicího boxu při teplotě -80 °C.

#### **4.12.5.1 Stanovení koncentrace bílkovin pomocí BCA**

Použitý materiál a roztoky:

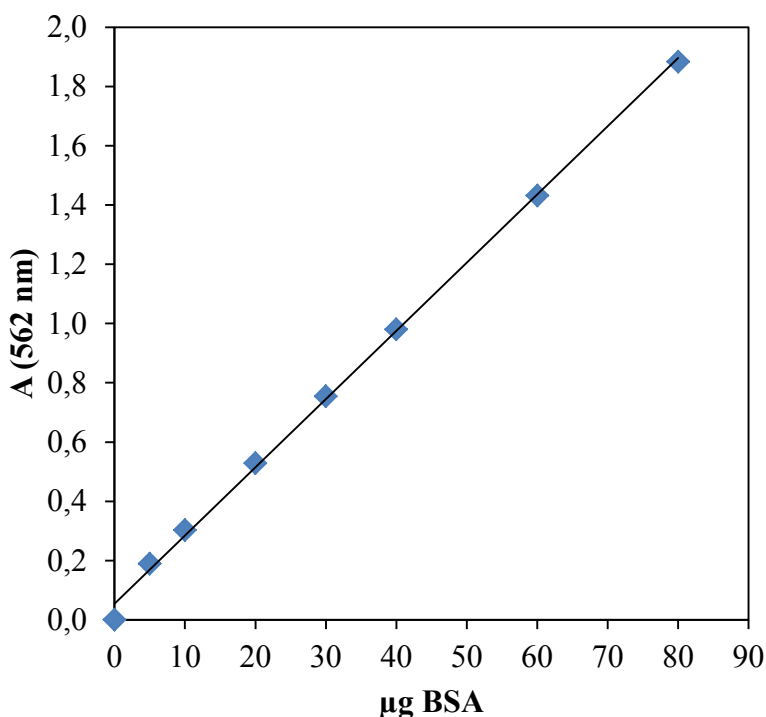
- Roztok A (Pierce): 1% kyselina bicinchoninová (BCA) (w/v); 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> · H<sub>2</sub>O (w/v); 0,16% Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · 2H<sub>2</sub>O (w/v); 0,4% NaOH (w/v); 0,95% NaHCO<sub>3</sub> (w/v); optimální pH 11,25
- Roztok B: 4% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (w/v)
- Pracovní roztok: 50 objemů roztoku A + 1 objem roztoku B

- Bovinní sérový albumin (BSA, Sigma): 2 mg/ml

Tato metoda je založena na reakci proteinů s měďnatými ionty, které jsou redukovány na ionty měďné a následně jsou schopny reagovat s BCA (bicinchoninic acid, BCA) za vzniku barevného komplexu, který absorbuje při vlnové délce 562 nm. K odečtení koncentrace proteinů ve vzorku byla sestavena kalibrační přímka s BSA.

Vzorky izolovaných membrán byly postupně rozmrazeny na ledu, aby nedošlo k jejich poškození náhlou změnou teploty. Po rozpuštění byly vzorky zamíchány a odebráno 5  $\mu$ l suspenze membrán do čisté mikrozkušavky typu Eppendorf. Objem v mikrozkušavkách byl doplněn do 50  $\mu$ l destilovanou vodou. Následně byl těsně před použitím namíchán pracovní roztok, který byl v objemu 1 ml přidán ke každému vzorku. Vzniklá směs byla důkladně promíchána a inkubována 30 minut při 37 °C ve vyhřátém bločku. Po zchladnutí vzorků na laboratorní teplotu byla měřena jejich absorbance při 562 nm na spektrofotometru Beckman Coulter DU 730 (kyveta 10 mm). Z rovnice kalibrační přímky (Obr. 11) byly odečteny koncentrace proteinů ve vzorcích. Kalibrační přímka byla připravena stejným způsobem jako vzorky, kdy bylo použito BSA o různých koncentracích.

#### Kalibrační přímka:



**Obr. 11** Kalibrační přímka závislosti absorpance na koncentraci bílkovin pomocí BSA

#### **4.12.5.2 Stanovení poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně**

##### Použitý materiál a roztoky:

- Koncentrovaná kyselina chloristá ( $\text{HClO}_4$ ) (Penta)
- 2,5% (w/v) molybdenan amonný (Lach-Ner)
- 10% (w/v) kyselina askorbová (Lach-Ner)
- Standard anorganického fosfátu – 0,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Roth)

Ke stanovení poměru lipid:protein byly použity výsledky z kapitoly 4.12.5.1, kdy byla stanovena koncentrace proteinů ve vzorku. Objem suspenze membrán, který odpovídal 45 µg proteinů, byl převeden do čistých několikrát vypláchnutých skleněných zkumavek (viz kapitola 4.12.3). Vzorky byly zality 0,5 ml koncentrované  $\text{HClO}_4$  (70%) a při teplotě 180 °C po dobu 20 minut mineralizovány v mineralizačním bloku. Po zchladnutí bylo ke vzorkům přidáno 3,5 ml deionizované vody a 0,5 ml 2,5% (w/v) molybdenanu amonného. Směs byla důkladně promíchána a poté bylo přidáno 0,5 ml 10% (w/v) kyseliny askorbové a vše opět důkladně promícháno. Vzniklá reakční směs byla zahřívána 5 minut při teplotě 100 °C na vodní lázni.



Po ochlazení vzorků byla měřena absorbance vzniklého modrého zabarvení (fosfomolybdenová modř) při vlnové délce 820 nm na spektrofotometru Beckman Coulter DU 730 (kyvety 10 mm). Pro přesné určení koncentrace fosfátu ve vzorcích byla sestavena kalibrační přímka standardu 0,2 mM zásobního roztoku fosfátu ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) stejně jako v kapitole 4.12.3. Podle rovnice  $n = m/M_r$  byl spočítán obsah fosfolipidů  $m$  ( $\mu\text{g}$ ) z izolovaných membrán. Látkové množství  $n$  ( $\mu\text{mol}$ ) bylo stanoveno přepočtem z rovnice směrnice kalibrační přímky standardu. Pro dosazení molekulové hmotnosti  $M_r$  do vzorce byla použita hodnota pro molekulu fosfolipidu odpovídající 700 g/mol.

#### 4.12.6 Lyze lipozómů

##### Použitý materiál a roztoky:

- Pufr: 100 mM NaCl; 0,5 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Sigma-Aldrich); 5 mM HEPES (Fluka); pH 7,4
- Sephadex G-25M (GE Healthcare)
- Kolona pro gelovou filtraci (Bio-Rad)
- Polykarbonátové filtry, velikost pórů 100 nm (Avestin)
- 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG),  
1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) (Avanti Polar Lipids)
- Chloroform (Sigma-Aldrich)
- 50 mM 5(6)-Carboxyfluorescein v 5 mM HEPES, pH 7,4
- 1% Triton X-100 (Amersham)
- 1mM surfaktin (Sigma-Aldrich)

Fosfolipidy DPPG a DPPE rozpuštěné v chloroformu byly namíchány v patřičných poměrech o celkovém výsledném množství 2 mg do čistých skleněných zábrusových zkumavek. Poté byl chloroform odpařen proudem plynného dusíku za vzniku tenké vrstvy lipidů na stěnách zábrusových zkumavek. Následně byly do zkumavek přidány 2 ml roztoku carboxyfluoresceinu a za intenzivního třepání a zahřívání na teplotu 38 °C došlo k postupnému smytí lipidů ze stěn zkumavek. Smytím lipidů ze stěn došlo ke vzniku mnohvrstevných lipozómů, do nichž je uzavřen roztok fluorescenční sondy o takové koncentraci, kdy je fluorescence carboxyfluoresceinu zhasena. Velikost váček byla sjednocena pomocí polykarbonátového filtru. Objem vzorku byl pomocí zařízení LiposoFast (Avestin) několikrát (asi 10x) protlačen přes polykarbonátový filtr s definovanou velikostí pórů (100 nm). Tím byly získány jednovrstevné lipozomy o stejné velikosti odpovídající velikosti pórů polykarbonátového filtru.

Před měřením byla fluorescenční sonda z vnějšího prostředí lipozómů odstraněna gelovou filtrací na koloně se Sephadexem G-25M. Sephadex byl den předem hydratován v nadbytku pufru (3 hodiny při laboratorní teplotě) a poté umístěn do lednice při 4 °C. Po nalití vzorků do kolony a jejím promývání pufrém byly jímány jednotlivé frakce vytékající z kolony v objemu 0,5 ml a charakterizovány na spektrofluorometru Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Horiba) při vlnové délce excitačního světla 480 nm. Byly použity křemenné kyvety (10 mm). Porovnávala se intenzita fluorescence při 518 nm (emise) jednotlivých frakcí před přidavkem a po přidavku detergentu Triton X-100 o výsledné koncentraci 0,01%, který způsobil úplnou lyzi lipozómů, tj. vylití a vyředění sondy do pufru. Čím vyšší byl podíl těchto dvou intenzit, tím větší část fluorescenční sondy byla uzavřena v lipozómech. Frakce obsahující lipozómy byly poté smíchány a použity pro sledování kinetiky lyze lipozómů po přidavku surfaktinu o výsledné koncentraci 10 µM.

Emitované světlo bylo registrováno ve směru kolmém na excitační záření a hodnoty byly zaznamenávány. Do grafu byly vynášeny hodnoty intenzity fluorescence v závislosti na čase  $t$ . Z naměřených intenzit fluorescence bylo vypočítáno procento lyze lipozómů podle vztahu  $F_{\text{poč}}/F_{\text{max}} \cdot 100$ , kdy  $F_{\text{poč}}$  je intenzita fluorescence před přidavkem surfaktinu a  $F_{\text{max}}$  je intenzita fluorescence po přidání detergentu Triton X-100, který způsobí maximální lyzi.

#### **4.12.7 Měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH**

##### Použitý materiál a roztoky:

- Sonda: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) ve směsi aceton-voda (1:1, v/v)
- Pufr: 50 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), pH 6,6
- Chloroform (Sigma-Aldrich)

Pro stanovení změn v mikroviskozitě membrán, které byly izolovány z bakteriálních buněk rostoucích na agarových plotnách bez surfaktinu, resp. se surfaktinem, byla použita metoda měření anizotropie fluorescence (Shinitzky & Barenholz 1974; Shinitzky & Barenholz 1978) hydrofobní sondy DPH. Sonda DPH se při styku s membránou inkorporuje do lipidové dvojvrstvy membrány a lokalizuje se v oblasti řetězců mastných kyselin fosfolipidů. Pro měření byly použity izolované cytoplazmatické membrány (kapitola 4.12.5) a lipidová frakce (kapitola 4.12.1).

Izolované cytoplazmatické membrány byly resuspendovány ve 3 ml pufru Tris-HCl v koncentraci 30 µg/ml. Měření probíhalo v křemenných kyvetách za stálého míchání na

spektrofluorometru Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Horiba) v rozmezí teplot 20 °C až 40 °C. Kyvetový prostor byl temperován na požadovanou teplotu pomocí průtokového termostatu (Julabo). Teplota v kyvetovém prostoru byla měřena pomocí termistorového teploměru a zaznamenávána. Měření probíhalo při vlnové délce excitačního světla 360 nm a emitovaného záření 450 nm. Po ustálení teploty na 40 °C bylo ke vzorku přidáno odpovídající množství fluorescenční sondy na konečnou koncentraci 1 μM. Následovala inkubace při této teplotě po dobu 20 minut, aby došlo k zabudování fluorescenční sondy do membrán. Následně byl kyvetový prostor postupně ochlazován na teplotu 20 °C a byla sledována změna anizotropie fluorescence sondy DPH.

Izolovaná lipidová frakce byla před měřením nejdříve rozpuštěna v čistém chloroformu a převedena do zábrusových zkumavek. Chloroform byl poté odpařen proudem plynného dusíku za vzniku tenkého filmu lipidů na stěnách zkumavky. Poté bylo do zkumavek přidáno 2,8 ml pufru Tris-HCl a dále byly vytřepávány váčky za občasného zahřívání na 40 °C (viz kapitola 4.12.6). Získaný vzorek byl měřen stejným způsobem jako izolované cytoplazmatické membrány (viz výše).

K výpočtu anizotropie fluorescence bylo použito vztahů mezi intenzitami  $I_{\parallel}$  a  $I_{\perp}$  - kdy  $I_{\parallel}$  udává intenzitu emitovaného světla polarizovaného vertikálně a  $I_{\perp}$  udává intenzitu světla polarizovaného horizontálně. Ze vztahů těchto dvou hodnot lze spočítat anizotropii fluorescence  $r$ .

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}}$$

## 5 VÝSLEDKY

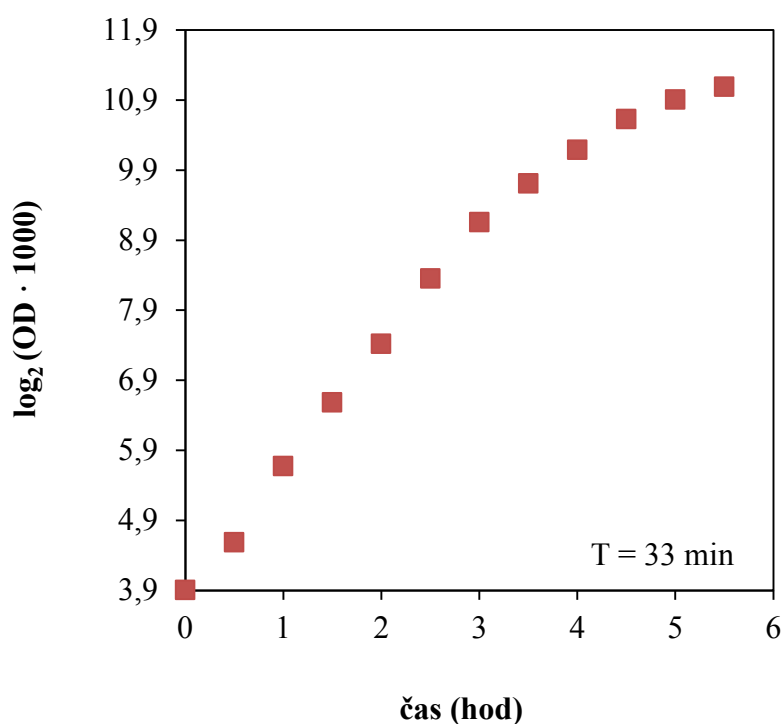
Tématem diplomové práce je studium mechanismů tolerance na úrovni lipidové složky cytoplazmatické membrány *Bacillus subtilis* 168 k membránově aktivnímu lipopeptidu surfaktinu. Tato bakterie sice nese úplnou genetickou informaci potřebnou k biosyntéze surfaktinu, ale surfaktin neprodukuje. V jejím genu *sfp*, který kóduje esenciální kofaktor biosyntézy surfaktinu 4'-fosfopantethein, se nachází bodová mutace způsobující neschopnost předávat si peptidový řetězec surfaktinu mezi jednotlivými moduly syntetického aparátu. Podobně jako jsou však u bakterie přítomny geny pro produkci surfaktinu, lze důvodně předpokládat, že jsou v genomu bakterie stejně jako u ostatních producentů antibiotik přítomné i geny pro rezistenci k surfaktinu. Kmen *B. subtilis* 168 neprodukující surfaktin by měl mít tedy potenciál adaptace cytoplazmatické membrány, která je zásahovým místem tohoto antibiotika, které bylo získáváno izolací z kultury produkčního kmene *B. subtilis* ATCC 21332. Předkládaná diplomová práce si kladla za cíl zjistit, zda se tolerance vůči surfaktinu odehrává na úrovni změny zásahového místa, jaké jsou fyziologické důsledky případných adaptivních změn a jestli tyto modifikace přispívají k vyšší odolnosti vůči surfaktinu.

Prvotním cílem práce bylo nalézt takovou subletální koncentraci, která by způsobila měřitelnou změnu růstových vlastností bakterie *B. subtilis* a vyvolala by tedy obranou reakci. Následovala analýza vlastností cytoplazmatických membrán vystavených působení surfaktinu, kdy byla očekávána změna ve složení lipidů a ve fyzikálních vlastnostech cytoplazmatické membrány jako zásahového místa antibiotika surfaktinu. Tyto změny by měly adaptovaným buňkám zajistit přežití v koncentracích surfaktinu, které jsou pro bakterie jiných druhů letální.

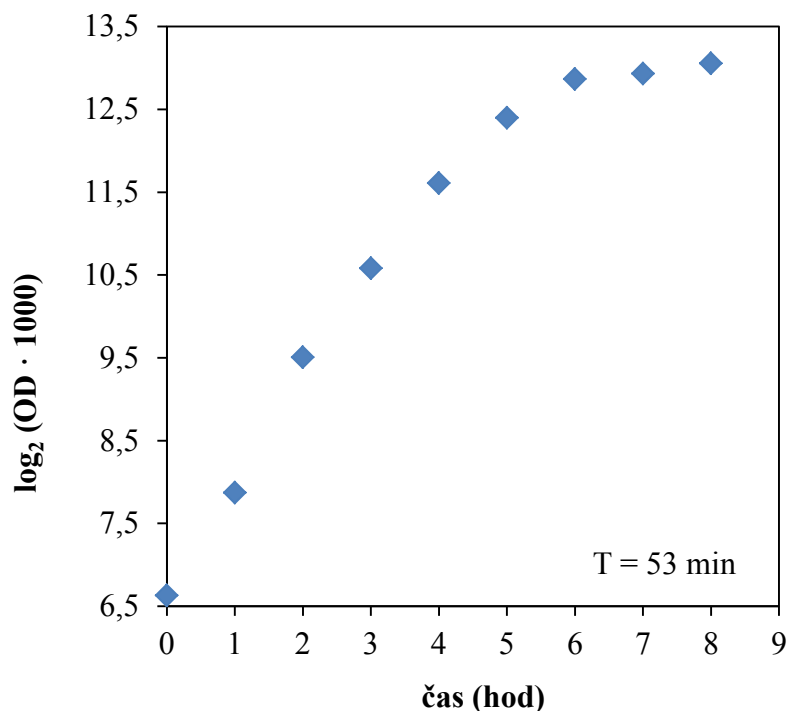
Porovnáním složení a fyzikálních vlastností cytoplazmatické membrány kontrolní kultury *B. subtilis* 168 s cytoplazmatickou membránou téhož kmene vystaveného subletální koncentraci surfaktinu, byly určeny změny v celkovém složení a vlastnostech membrány. Biochemické změny na membráně vyvolané účinkem surfaktinu byly analyzovány pomocí jednorozměrné tenkovrstevné chromatografie (TLC) a plynové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Fyzikální vlastnosti membrány byly analyzovány pomocí měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH. Význam adaptivních změn ve složení fosfolipidů byl sledován pomocí kinetiky lyze lipozómů indukované surfaktinem.

## 5.1 Růst *B. subtilis* 168 v tekutém médiu a na pevné půdě

Vzhledem k tomu, že buňky nebylo možné kultivovat v tekutém médiu, jelikož dochází po přidání izolátu surfaktinu do vodného prostředí k jeho vysrážení (Stružinská 2010), bylo cílem těchto pokusů prokázat exponenciální růstu *B. subtilis* 168 na pevné půdě. Bakterie byly kultivovány v živném médiu (Oxoid) a na živném agaru (Oxoid). Příprava inokula probíhala podle postupu popsáno v kapitolách 4.2.3.1, resp. 4.2.3.2.



**Obr. 12** Růst *B. subtilis* 168 v tekutém médiu. Hodnoty v grafu jsou průměrem výsledků z pěti nezávislých růstových pokusů.



**Obr. 13** Růst *B. subtilis* 168 na pevné půdě. Hodnoty v grafu jsou průměrem výsledků z pěti nezávislých růstových pokusů.

Z grafů na Obr. 12 a 13 je zřejmé, že bakterie rostou exponenciálně na obou typech kultivačních médií. V tekutém médiu je však růst bakterií rychlejší, kultura roste s dobou zdvojení  $T = 33$  min, oproti tomu bakterie na pevné půdě stejného složení rostou s dobou zdvojení  $T = 53$  min. Buňky rostoucí na pevné půdě přechází do stacionární fáze po 5 hodinách exponenciálního růstu, přičemž během této doby vznikne celkem 6 generací buněk. Buňky rostoucí v tekutém médiu přechází do stacionární fáze po 4 hodinách exponenciálního růstu a za tuto dobu v kultuře opět vznikne 6 generací buněk. Růst na obou typech půd je tedy možné v tomto ohledu považovat za srovnatelný.

Tímto pokusem byl prokázán exponenciální růst bakterie *B. subtilis* 168 na pevné půdě s reprodukovatelnou dobou zdvojení.

## 5.2 Optimalizace produkce a izolace surfaktinu z kultury *B. subtilis* ATCC 21332

Vzhledem k předpokládané odolnosti bakterie *B. subtilis* 168 k vysokým koncentracím surfaktinu a tím i velké spotřebě izolátu, byla snaha dosáhnout co nejvyšší produkce a výtěžnosti surfaktinu z produkčního média. Optimalizace z hlediska zvýšení produkce a výtěžku surfaktinu probíhala pomocí testování růstu a produkce surfaktinu produkčním kmenem *B. subtilis* ATCC 21332 na vybraných médiích. Na základě rešerše literatury byla zvolena celkem tři média popsaná v kapitolách 4.1.2.2, 4.1.2.3 a 4.1.2.4. Tato minerální média se liší především v přidavku aktivního uhlí u média popsaného v kapitole 4.1.2.3 a zvýšenou koncentrací železnatých iontů u média popsaného v kapitole 4.1.2.4.

Nejprve byl na všech třech zvolených médiích charakterizován růst *B. subtilis* ATCC 21332, a to až do přechodu do stacionární fáze růstu, kdy se spouští syntéza surfaktinu (Tab. 1). V médiu dle Coopera (Cooper *et al.* 1981) rostly buňky s dobou zdvojení  $T = 103$  min. V médiu dle Coopera s přidavkem aktivního uhlí (Yeh *et al.* 2005) se doba zdvojení pohybovala kolem 75 minut. U tohoto média byl však problém určit přesnou dobu zdvojení, jelikož docházelo postupem času k rozpadu částic aktivního uhlí. Vzniklý nehomogenní sediment následně zkresloval pozadí při měření optické denzity buněk. Posledním vybraným médiem bylo médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů (Wei *et al.* 2003). V tomto médiu buňky rostly s dobou zdvojení cca  $T \sim 150$  min, opět se zde ale vyskytoval problém při měření optické denzity, kdy pozadí zkreslovala vzniklá sraženina železa. Přesná doba zdvojení byla proto velmi obtížně stanovitelná.

Paralelně s charakterizací růstových vlastností buněk v těchto médiích byly jednotlivé kultury o objemu 100 ml ponechány růstu a produkci surfaktinu po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby byly buňky centrifugací odstraněny z média a z každého typu média byl odebrán vzorek pro změření koncentrace surfaktinu v médiu pomocí LC/MS. Následně bylo s médii zbavených buněk nakládáno podle postupu popsaného v kapitole 4.2.6 a z jednotlivých získaných izolátů surfaktinu byly opět odebrány alikvoty pro měření pomocí LC/MS. Produkce, výtěžky a účinnost extrakce surfaktinu z jednotlivých médií jsou shrnuty v Tab. 1.

V prvním případě bylo použito médium dle Coopera (Cooper *et al.* 1981), které se běžně používá k produkci a izolaci surfaktinu. Hodnoty v Tab. 1 byly přepočítány na objem 1 litru média. Před izolací surfaktinu bylo v médiu přítomno 1655 mg surfaktinu na 1 litr

média, následně se podařilo z média získat 1161 mg surového surfaktinu na 1 litr média. Porovnáním obsahu surfaktinu v médiu a koncentrace izolovaného surfaktinu byla stanovena celková účinnost extrakce, která dosahovala přibližně 70 %.

Dále bylo testováno médium dle Coopera s přidavkem aktivního uhlí (Yeh *et al.* 2005). Aktivní uhlí zde má fungovat jako stimulátor růstu buněk a nosič pro tvorbu biofilmu, čímž se dosahuje vyššího nárůstu buněk a zvýšené produkce surfaktinu. Z Tab. 1 je oproti prvnímu typu média patrný nižší obsah surfaktinu v médiu a nižší účinnost extrakce než u média dle Coopera. Před izolací surfaktinu se v médiu nacházelo celkem 105 mg surfaktinu na 1 litr média a následnou izolací bylo získáno 2,41 mg surfaktinu z 1 litru média, celková účinnost extrakce tak činila pouhé 2 %.

Třetím vybraným médiem bylo médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů (Wei *et al.* 2003). V tomto případě dochází ke vzniku sraženiny v důsledku vysoké koncentrace solí železa, vzniklá sraženina pak má opět fungovat jako nosič pro tvorbu biofilmu. Kultura v tomto médiu dorůstala do velmi nízkých denzit, které byly navíc kvůli přítomnosti sraženiny velmi obtížně stanovitelné. Tomu poté odpovídala i skutečnost, že se nepodařilo získat dostatek surfaktinu pro změření konečné koncentrace v médiu a tudíž nemohla být určena účinnost extrakce. Pouze byl pomocí LC/MS změřen konečný výtěžek surfaktinu, který činil 0,02 mg z 1 litru média.

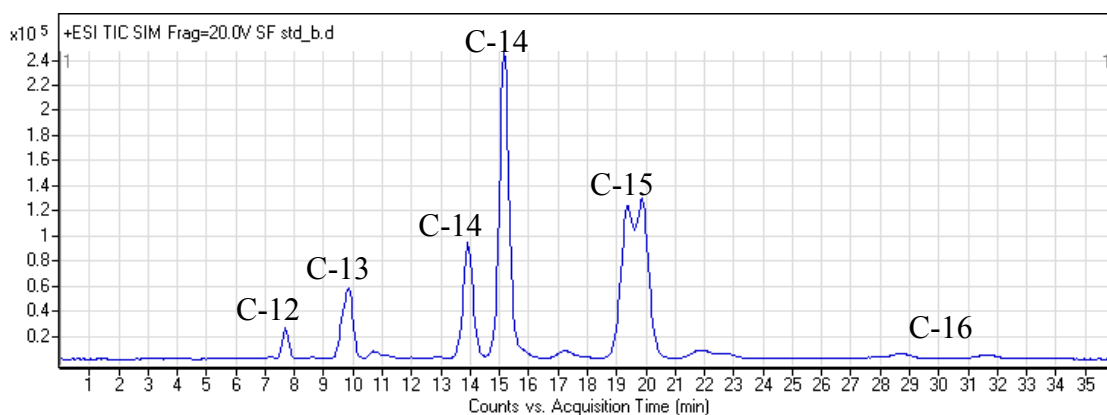
Z uvedených dat v Tab. 1 je patrné, že se nám nepodařilo dosáhnout očekávaného zvýšení produkce surfaktinu oproti tradičnímu médiu dle Coopera. Proto byl surfaktin nadále izolován z tohoto média. Celkem bylo během vypracovávání této diplomové práce připraveno šest izolátů, z nichž byly izoláty I, II a III použity ke stanovení subletální koncentrace surfaktinu (viz kapitola 4.2.8) a izoláty IV, V a VI byly použity k izolaci buněk vystavených účinkům surfaktinu (viz kapitola 4.2.9).



**Tab. 1** Růst a produkce surfaktinu bakterií *B. subtilis* ATCC 21332 na třech typech médií. Koncentrace surfaktinu byla vždy stanovena paralelně přímo v produkčním médiu a metanolovém izolátu surfaktinu z média.

	<b>Médium dle Coopera</b> (Cooper <i>et al.</i> 1981)	<b>Médium dle Coopera s přídavkem aktivního uhlí</b> (Yeh <i>et al.</i> 2005)	<b>Médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů</b> (Wei <i>et al.</i> 2003)
<b>Doba zdvojení T (min)</b>	103	75	150
<b>Obsah surfaktinu (mg) v 1 litru média</b>	1655	105	—
<b>Izolovaný surfaktin (mg) z 1 litru média</b>	1161	2,41	0,02
<b>Účinnost extrakce</b>	70 %	2 %	—

Z Tab. 2 a Obr. 14 je patrné, že surfaktin je vždy směsí pěti izoform surfaktinu, které jsou ve vzorku v různém zastoupení. Jednotlivé izoformy se liší počtem atomů uhlíku v řetězci  $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny. Majoritní izoformou standardu je C-14 a C-15 surfaktin. Zbylé tři izoformy (C-12, C-13 a C-16) jsou ve zcela minoritním zastoupení a tvoří dohromady asi 12 % celku. U jednotlivých izolátů z kultury *B. subtilis* ATCC 21332 jsou opět majoritně zastoupeny izoformy surfaktinu s délkou  $\beta$ -hydroxy mastné kyseliny 14 a 15 uhlíků. Isoformy C-12, C-13 a C-16 jsou v izolátech surfaktinu opět v minoritním zastoupení stejně jako tomu je u standardu surfaktinu. Jednotlivé izoláty se, co se výtěžnosti surfaktinu týče, neliší s výjimkou izolátu II. Výtěžek se u jednotlivých izolátů pohybuje kolem 300 mg/l. Izoláty I a II byly získány z celkového objemu média 1 litr, zbylé izoláty (III – VI) byly získány z média o objemu 2 litry.



**Obr. 14** Chromatogram standardu surfaktinu (Sigma). Osa **x** udává retenční čas (min) a osa **y** intenzitu signálu (arbitrary units). Každý z vrcholů představuje jednu izoformu surfaktinu s délkou řetězce mastné kyseliny 12, 13, 14, 15 a 16 uhlíků.

**Tab. 2** Procentuální zastoupení jednotlivých izoform surfaktinu ve standardu a v izolátech. Izoformy surfaktinu jsou dány délkou řetězce mastné kyseliny (12 – 16 uhlíků). Celkový výtěžek surfaktinu (mg) – množství získaného lipopeptidu v jednotlivých izolátech. Výtěžek surfaktinu mg/l - množství získaného surfaktinu vztažené na 1 litr kultivačního média.

zkratka	m/z m/z Na <sup>+</sup>	Standard	Izolát I	Izolát II	Izolát III	Izolát IV	Izolát V	Izolát VI
C-12 (%)	994,6	2,1	0,5	0,5	0,7	1,0	0,8	0,7
	1016,6							
C-13 (%)	1008,6	8,2	6,8	8,1	6,5	8,0	7,0	6,9
	1030,6							
C-14 (%)	1022,6	45,3	50,4	47,2	45,9	46,0	47,0	47,5
	1044,6							
C-15 (%)	1036,6	43,2	39,0	41,2	35,1	41,9	41,7	41,4
	1058,6							
C-16 (%)	1050,6	1,9	3,3	3,0	2,9	3,1	3,6	3,4
	1072,6							
Celkový výtěžek surfaktinu (mg)			361	565	679	559	459	557
Výtěžek surfaktinu mg/l			361	565	340	280	230	279

Celkem bylo ze všech šesti izolátů získáno 3304 mg surfaktinu. Chemické složení a množství izolovaného surfaktinu z kultury *B. subtilis* ATCC 21332 se vyznačuje vysokou reprodukovatelností.

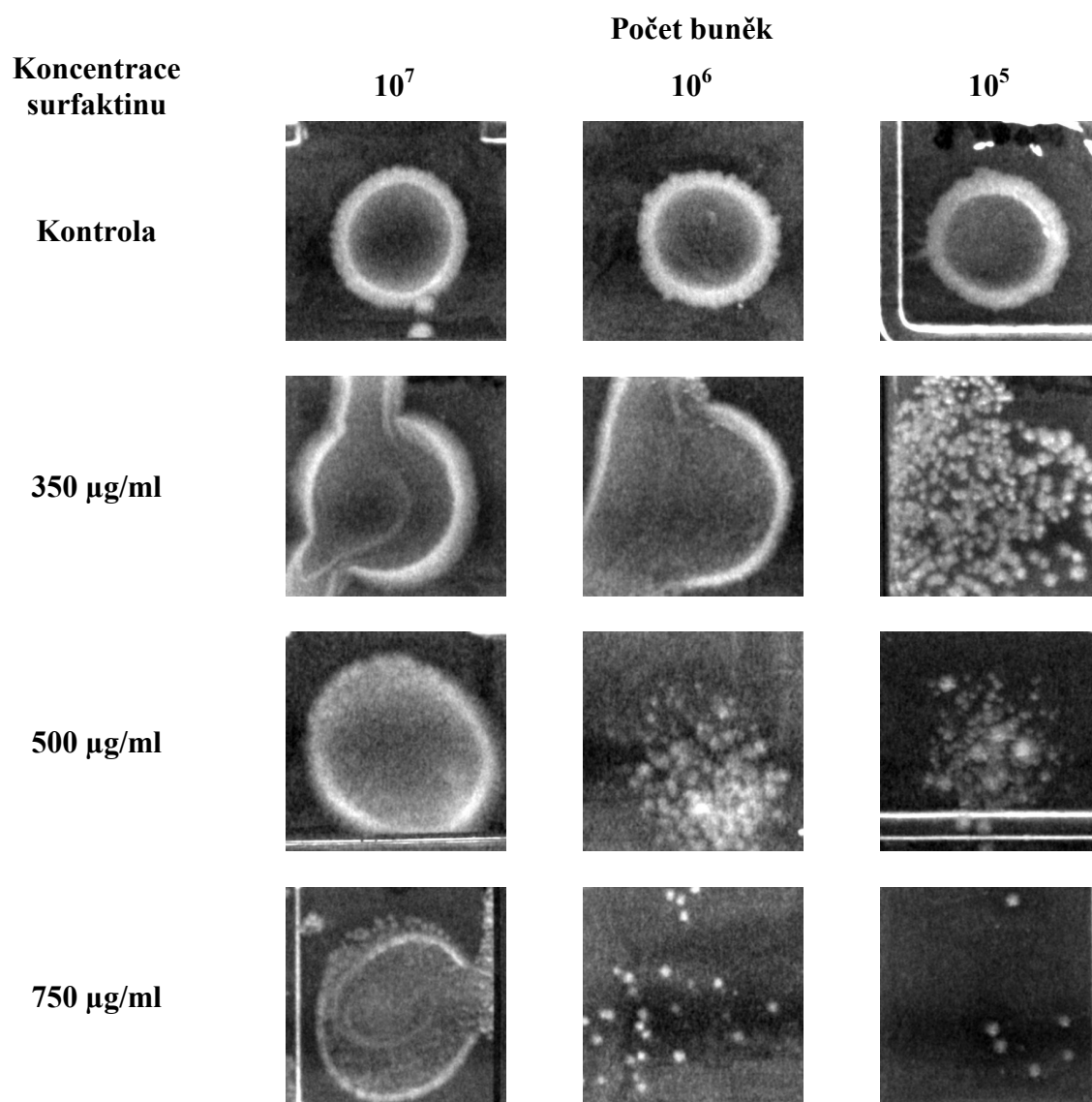
## 5.3 Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro *B. subtilis* 168

### 5.3.1 Kapkový test

Míra antibakteriálního účinku surfaktinu je dána nejen jeho koncentrací, ale také počtem buněk, resp. množstvím molekul fosfolipidů v jejich membránách, se kterými surfaktin interaguje. Počet molů surfaktinu interagujících s fosfolipidy cytoplazmatické membrány, tedy poměr surfaktin-fosfolipid, byl *in vitro* popsán jako tzv.  $R_b$  parametr (viz kapitola 3.4). Tento parametr vyjadřuje míru interakce surfaktinu s membránou a schopnost surfaktinu membránu permeabilizovat. Pro stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro *B. subtilis* bylo tedy nutné vzít v úvahu dvě proměnné, a to velikost inokula a koncentraci surfaktinu.

Ke stanovení přesného množství a ředění inokula odpovídajícího testovanému množství buněk nanášeného na misky, bylo nutné nejdříve určit počet živých buněk v exponenciálně rostoucí kultuře - tzv. colony forming unit (CFU). Počet buněk byl stanoven výsevem kultury na plotny podle postupu popsaného v kapitole 4.7. Tímto pokusem byl stanoven počet bakterií v 1 ml kultury při  $OD_{420} = 0,500$ , ten odpovídal počtu  $4,4 \cdot 10^7$  buněk.

Tato exponenciálně rostoucí kultura byla patřičným způsobem ředěna, aby bylo získáno inokulum o různém počtu buněk, které byly nanášeny na povrch média s různou koncentrací surfaktinu. Konkrétně byla použita inokula o velikosti  $10^7$ ,  $10^6$  a  $10^5$  buněk, která byla nanesena na agarové plotny s koncentrací surfaktinu 350  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$  a 750  $\mu\text{g/ml}$  (Obr. 15 a Tab. 3). Inkubace probíhala při 30 °C po dobu 14 hodin. Procento inhibice bylo stanovováno ve 14. hodině porovnáním nárůstu biomasy na kontrolních miskách s nárůstem biomasy na miskách se surfaktinem. Cílem bylo nalézt takový poměr množství inokula a koncentrace surfaktinu, který vyvolá 30% inhibici růstu. Tyto podmínky by měly vyvolat měřitelnou odpověď na přítomnost surfaktinu, ale zároveň by neměly větší mírou omezovat životaschopnost testované kultury.



**Obr. 15** Kapkový test. Test citlivosti *B. subtilis* 168 k surfaktinu v závislosti na velikosti inokula (kapka o velikosti 10  $\mu\text{l}$ ).

**Tab. 3** Nárůst bakteriální biomasy v závislosti na velikosti naneseného inokula a koncentraci surfaktinu vyjádřený pomocí OD bakteriální biomasy a velikosti kolonií. Nárůst kontrolní kultury představuje 100 %.

		počet buněk		
		$10^7$	$10^6$	$10^5$
<b>kontrola</b>	<b>OD</b>	3,1	2,2	1,9
	<b>velikost kolonie (mm)</b>	8,0	8,2	8,0
<b>350 µg/ml</b>	<b>OD</b>	3,3	2,1	1,6
	<b>velikost kolonie (mm)</b>	10,1	11,0	kolonie
	<b>% nárůstu</b>	107	99	84
<b>500 µg/ml</b>	<b>OD</b>	3,8	1,1	0,8
	<b>velikost kolonie (mm)</b>	10,8	kolonie	kolonie
	<b>% nárůstu</b>	124	50	40
<b>750 µg/ml</b>	<b>OD</b>	3,3	kolonie	kolonie
	<b>velikost kolonie (mm)</b>	11,9	kolonie	kolonie
	<b>% nárůstu</b>	106	—	—

Z Obr. 15 a Tab. 3 je zřejmé, že velikost inokula nanesená na kontrolní misky bez surfaktinu ovlivňuje celkový nárůst biomasy, kdy došlo k poklesu optické denzity buněk z  $OD_{420} = 3,1$  u inokula o velikosti  $10^7$  buněk na  $OD_{420} = 2,2$  u inokula o velikosti  $10^6$  buněk a na  $OD_{420} = 1,9$  u inokula o velikosti  $10^5$  buněk.

Při použití koncentrace surfaktinu 350 µg/ml nedošlo u inokula  $10^7$  a  $10^6$  buněk k žádnému poklesu OD biomasy proti kontrolním nárůstům. Pouze u nejmenšího inokula  $10^5$  buněk došlo proti kontrole k poklesu nárůstu o 16 %. U toho inokula byly v místě nanesení kapky na povrchu agarů rozeznatelné pouze jednotlivé kolonie.

U koncentrace surfaktinu 500 µg/ml je vliv velikosti inokula velmi zřetelný. Při použití inokula o velikosti  $10^7$  buněk došlo ke zvýšení optické denzity proti kontrole z  $OD_{420} = 3,1$  na  $OD_{420} = 3,8$ , tj. k nárůstu celkového množství biomasy na 124 %. Velikost kolonie se proti kontrole zvýšila o 25 %. Naopak u o řád nižšího inokula o velikosti  $10^6$  buněk byl vliv surfaktinu na růst *B. subtilis* inhibiční. Došlo ke snížení optické denzity proti kontrole z  $OD_{420} = 2,2$  na  $OD_{420} = 1,1$  a tedy k poklesu nárůstu buněk o 50 %, na povrchu agarů byly patrné pouze jednotlivé kolonie.

Při koncentraci surfaktinu 750 µg/ml byla optická denzita nárůstu u inokula o velikosti  $10^7$  buněk téměř shodná s kontrolou. Nárůst buněk na agarových plotnách se vzhledem ke kontrole pohyboval kolem hodnoty 106 % s  $OD_{420} = 3,3$ . Při použití menšího inokula o

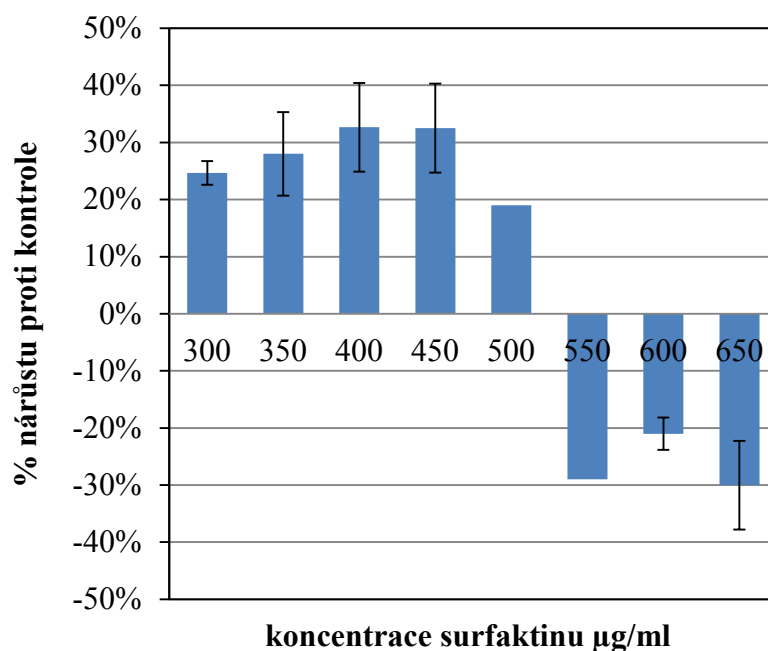
velikosti  $10^6$  buněk, došlo na povrchu agaru k nárůstu pouze jednotlivých kolonií, jejichž počet byl výrazně nižší než u předešlých koncentrací a stejné velikosti inokula. Při následném zmenšení inokula na velikost  $10^5$  buněk, byly pozorovány pouze nepatrné nárůsty buněk. Na agarových plotnách bylo pozorováno malé množství jednotlivých kolonií.

Pomocí kapkového testu byla prokázána závislost počtu buněk, resp. množství jejich fosfolipidů obsažených v membránách, na koncentraci surfaktinu v prostředí. Se zvyšující se koncentrací surfaktinu a snižujícím se počtem buněk, dochází k nižším nárůstům bakterií na plotnách a k vyšší letalitě buněk. Na základě těchto pokusů byla zvolena velikost inokula  $10^6$  a stanoveno užší koncentrační rozmezí surfaktinu pro stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro růst *B. subtilis*.

Před další kultivací *B. subtilis* v přítomnosti surfaktinu však bylo nutné ověřit, zda vybraná koncentrace surfaktinu bude mít na danou velikost inokula stejný efekt i v uspořádání pokusu, kdy inokulum není koncentrované v kapce, ale je rozetřeno po celé ploše agarového média a buňky, resp. jejich membrány jsou účinněji vystaveny působení surfaktinu. V následujících pokusech byly na agarové plotny opět nanášeny kapičky s velikostí inokula  $10^7$  a  $10^6$  buněk a v jednom případě byly ponechány zaschnout a v druhém případě byly rozetřeny na agarovou plotnu sterilní skleněnou tyčinkou. Nárůsty buněk se podle předpokladu u rozetřeného inokula proti zaschnutým kapičkám snížily (data nejsou ukázána). Na základě těchto výsledků bylo inokulum o velikosti bakterií  $10^7$  a koncentrace surfaktinu 300 – 650  $\mu\text{g/ml}$  podrobena dalšímu testování na pevné půdě (kapitola 5.3.2), kdy byla v úvahu vzata i plocha média se surfaktinem, která přichází s buňkami do kontaktu.

### **5.3.2 Růst *B. subtilis* 168 na pevném médiu se surfaktinem**

Stanovení subletální koncentrace surfaktinu pro bakterii *B. subtilis* 168 bylo prováděno na Petriho miskách o průměru 5,3 cm a 8,3 cm s přesným objemem živného agaru, příprava misek probíhala podle postupu popsaného v kapitole 4.3.2. Na agarové plotny bylo nanášeno inokulum o velikosti  $10^7$  buněk. S postupným zvyšováním koncentrace surfaktinu docházelo ke stimulaci růstu buněk a s dalším zvyšováním koncentrace surfaktinu docházelo k poklesu nárůstu buněk, růst bakterií byl inhibován (Obr. 16).



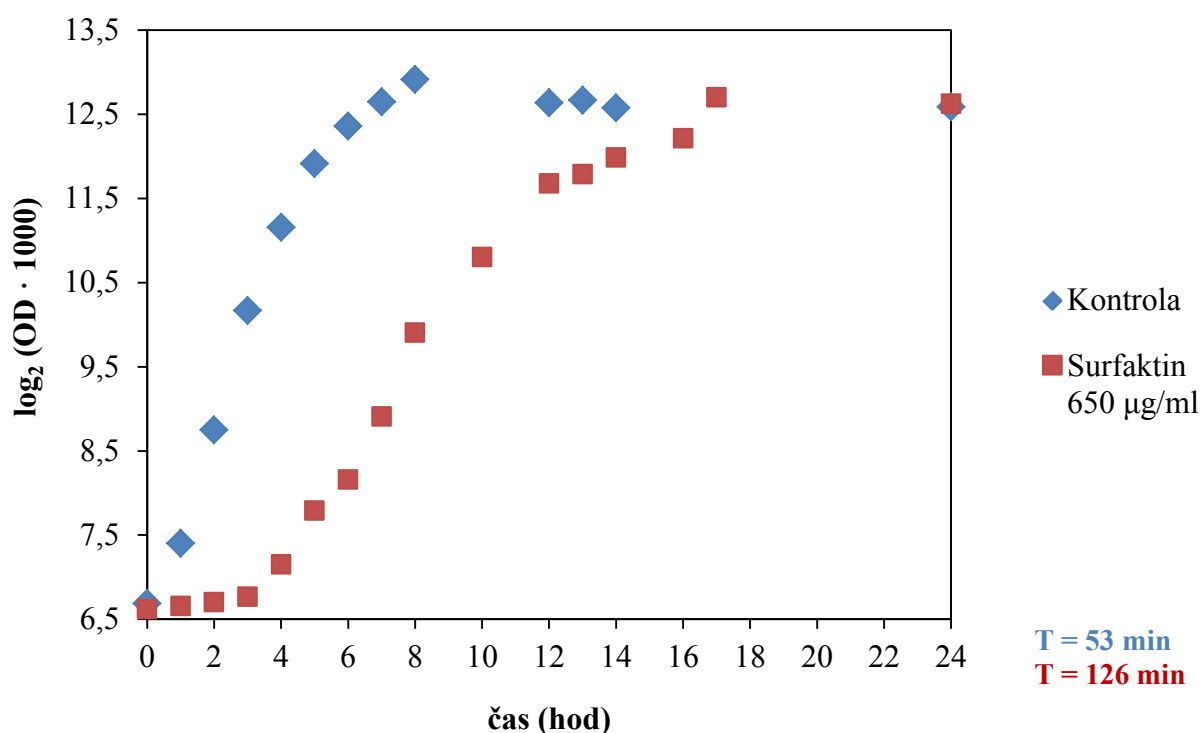
**Obr. 16** Procento celkového nárůstu bakteriální biomasy v závislosti na koncentraci surfaktinu. Hodnota 0 v grafu odpovídá 100% nárůstu buněk u kontrolních misek.

Z Obr. 16 je patrné široké rozmezí koncentrací surfaktinu, které vedou ke zvýšení nárůstu biomasy oproti kontrole, tj. způsobují stimulaci růstu. Růst buněk je stimulován v rozmezí koncentrací 300 – 500  $\mu\text{g/ml}$ . Míra stimulace se u jednotlivých koncentrací pohybuje v rozmezí 20 – 40 %, následně dochází k prudkému poklesu nárůstu buněk u koncentrace 550  $\mu\text{g/ml}$ , kdy se nárůst buněk pohyboval okolo 70 % proti kontrolní biomase. Hledané optimum inhibiční koncentrace surfaktinu (30% pokles celkového nárůstu oproti kontrole) se pohybovalo v rozmezí 550 – 650  $\mu\text{g/ml}$ . Lze tedy pozorovat tzv. koncentrační plató jak u stimulačních tak u inhibičních koncentrací surfaktinu, tj. že dané rozmezí koncentrací má na růst buněk stejný vliv.

Pro další kultivace za účelem růstové charakterizace a přípravy bakteriální biomasy adaptované k surfaktinu byly zvoleny koncentrace 650  $\mu\text{g/ml}$  pro inhibici růstu a 350  $\mu\text{g/ml}$  pro stimulaci růstu.

### 5.3.2.1 Růst *B. subtilis* v přítomnosti surfaktinu a výběr časových intervalů pro analýzu cytoplazmatických membrán

Pro stanovení růstových vlastností buněk a následný výběr časových intervalů pro izolaci biomasy byly použity koncentrace surfaktinu 650  $\mu\text{g/ml}$  pro inhibici růstu (Obr. 17), resp. 350  $\mu\text{g/ml}$  pro stimulaci růstu (Obr. 18). Růst *B. subtilis* v přítomnosti surfaktinu byl sledován na agarových plotnách s průměrem 8,3 cm připravených podle postupu popsáno v kapitole 4.3.2. Odběry biomasy probíhaly v hodinových intervalech, kdy byly omyty fyziologickým roztokem vždy dvě paralelní misky (viz kapitola 4.6.2).



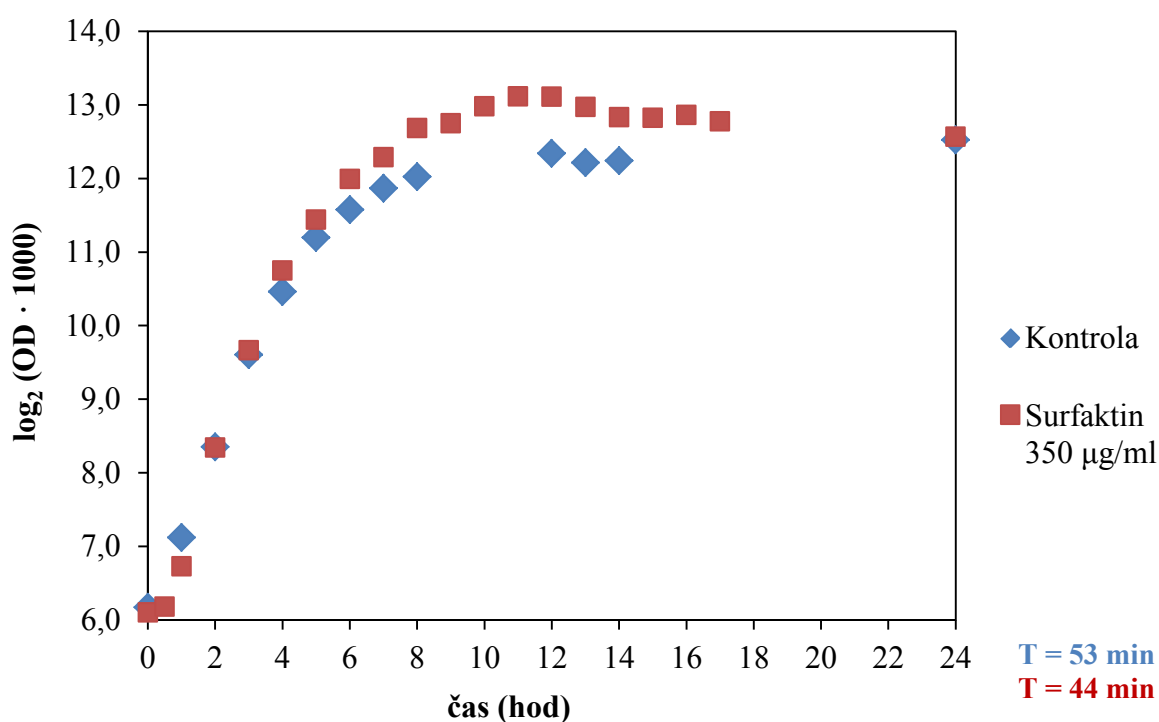
**Obr. 17** Růst *B. subtilis* 168 na pevné půdě – inhibiční koncentrace. Porovnání růstu bez přítomnosti surfaktinu (kontrola) a na médiu s inhibiční koncentrací surfaktinu (650  $\mu\text{g/ml}$ ). Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří nezávislých pokusů.

Na Obr. 17 je zobrazen graf porovnávající růstu bakterií *B. subtilis* 168 na pevné půdě v nepřítomnosti surfaktinu (kontrola) a s inhibiční koncentrací surfaktinu (650  $\mu\text{g/ml}$ ). Kontrolní kultura po vysetí začíná ihned exponenciálně růst, zatímco buňky na agarových plotnách se surfaktinem nejprve prochází 3 hodinovou lag fází a až následně obnovují svůj růst. Doba zdvojení  $T$  u kontrolních buněk byla stanovena na  $T = 53 \text{ min}$ , u buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu se doba zdvojení více než zdvojnásobila, a to na



$T = 126$  min. Přestože buňky vystavené surfaktinu rostou pomaleji, během jejich růstu vznikne celkem 6 generací buněk, stejně jako tomu je u buněk kontrolních. Kvůli pomalejšímu růstu buněk na agarových plotnách se surfaktinem dochází k jejich přechodu do stacionární fáze růstu později než u buněk kontrolních, zatímco buňky kontrolní do stacionární fáze růstu přechází po 5 hodinách, buňky vystavené účinkům surfaktinu přechází do stacionární fáze růstu až po 12 hodinách. Následně dochází u obou buněčných kultur k mírné lyzi buněk a po 24 hodinách dosáhnou stejného nárůstu biomasy v obou případech.

Ze stanovených růstových křivek byl zvolen čas sběru bakteriální biomasy, která byla následně použita pro izolaci a analýzu cytoplazmatických membrán. Buňky rostoucí na kontrolních miskách byly odebrány v exponenciální fázi v čase 3,5 hodiny. Buňky vystavené inhibiční koncentraci surfaktinu byly pro izolaci získávány opět v exponenciální fázi růstu, tentokrát ale v 10. hodině, vzhledem k jejich pomalejšímu růstu. Nárůst biomasy byl v obou případech shodný a činil  $OD_{420} = 1,5$ .



**Obr. 18** Růst *B. subtilis* 168 na pevné půdě – stimulační koncentrace. Porovnání růstu bez přítomnosti surfaktinu (kontrola) a na médiu se stimulační koncentrací surfaktinu. Hodnoty v grafu jsou průměrem ze tří nezávislých pokusů.

Z grafu na Obr. 18 je patrný rozdíl v růstových vlastnostech bakterií *B. subtilis* 168 na pevné půdě v nepřítomnosti surfaktinu (kontrola) a se stimulační koncentrací surfaktinu (350 µg/ml). Buňky po vysetí na agarové plotny se surfaktinem nejprve prochází 40 minutovou lag fází a následně obnovují svůj růst. Doba zdvojení těchto buněk byla stanovena na  $T = 44$  minut. Procento nárůstu buněk bylo opět určováno ze srovnání OD biomasy kontroly a stimulační koncentrace ve 14. hodině, v tomto případě bylo dosaženo u stimulační koncentrace surfaktinu nárůstu o 32 % vyššího, než bylo zaznamenáno u nárůstu na kontrolních miskách. Přechod do stacionární fáze růstu je jak u kontrolních buněk, tak u buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu stejně rychlý, a to v 5. hodině. Buňky stimulované surfaktinem však dosahují vyššího maximálního nárůstu, po 24 hodinách je ale OD buněk z kontrolních misek a z misek se surfaktinem stejný.

Odběr biomasy z kontrolní kultivace i kultivace se surfaktinem probíhal na základě růstových křivek v obou případech po 3,5 hodinách. Buňky vystavené účinkům surfaktinu rostou rychleji, ale kvůli počáteční 40 minutové lag fázi dosahují požadované optické denzity ( $OD_{420} = 1,5$ ) ve stejném čase jako buňky rostoucí na kontrolních agarových plotnách. Získaná biomasa buněk byla následně použita k izolaci cytoplazmatických membrán.

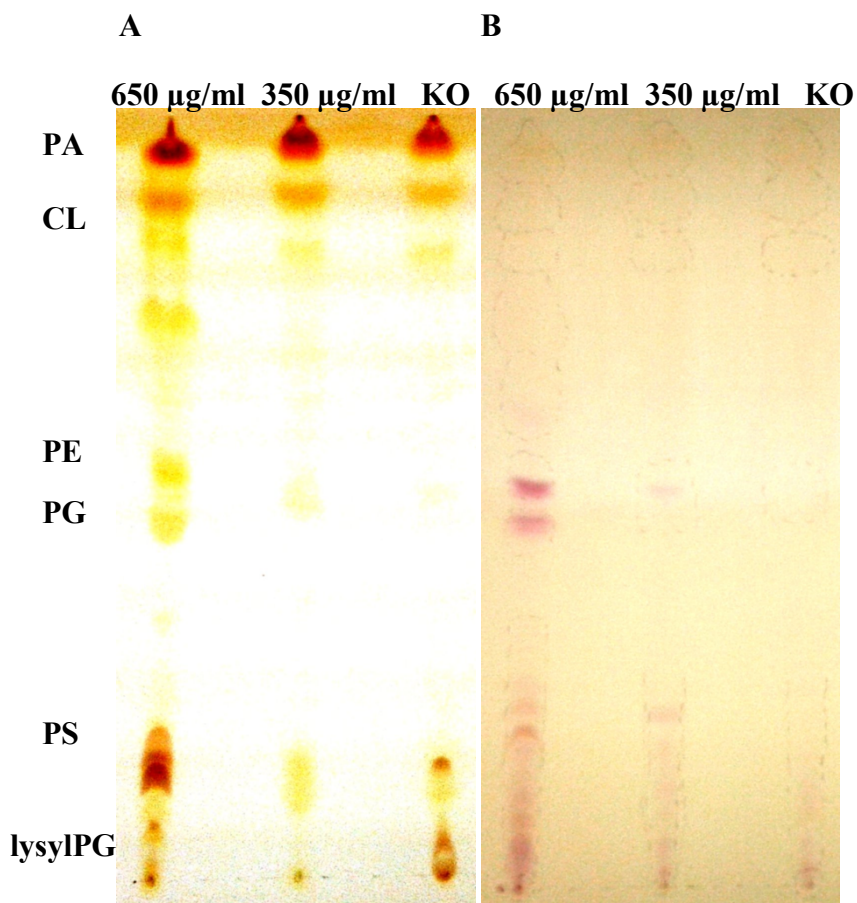
## **5.4 Adaptace cytoplazmatické membrány *B. subtilis* 168 k surfaktinu**

Při působení surfaktinu na bakteriální buňky je jeho zásahovým místem cytoplazmatická membrána. Při inkorporaci do membrány dochází k interakci surfaktinu s lipidy cytoplazmatické membrány a následně dojde k narušení její stability jako celku. Míra náchylnosti membrány k permeabilizaci surfaktinem je daná jejím lipidovým složením (viz kapitola 3.4). Cílem bylo tedy zjistit, jak se mění vlastnosti lipidové složky cytoplazmatické membrány v přítomnosti surfaktinu jak v inhibiční, tak stimulační koncentraci. Tyto získané vlastnosti buňkám zajišťují přežití nebo dokonce podporu růstu v koncentracích surfaktinu, které jsou pro bakterie jiných druhů letální.

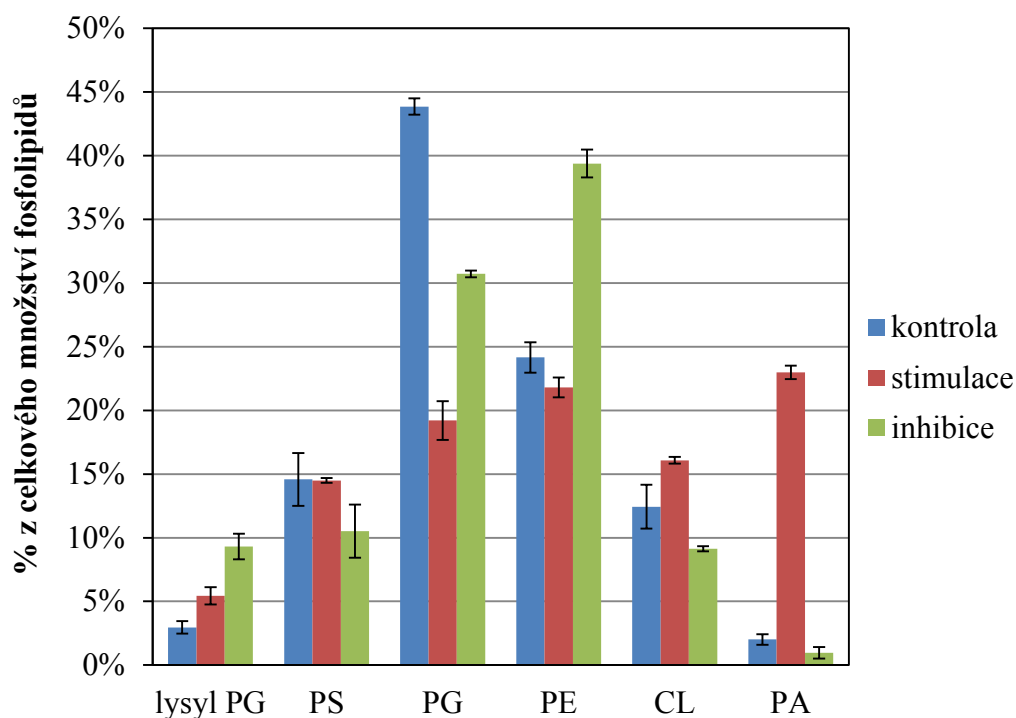
### **5.4.1 Složení polárních hlav fosfolipidů**

Z biomasy buněk vystavených inhibiční, resp. stimulační koncentraci surfaktinu, byla izolována lipidová frakce. Růst buněk byl ukončen v exponenciální fázi růstu smytím fyziologickým roztokem a následně z nich byla izolována lipidická frakce podle postupu popsaného v kapitole 4.12.1. Kontrolní vzorek lipidové frakce byl získán z buněk rostoucích na agarových plotnách bez surfaktinu. Analýza zastoupení fosfolipidových hlav byla

provedena pomocí tenkovrstevné chromatografie (Obr. 19 a 20). Příprava chromatografických esek a detekce fosfolipidů byly popsány v kapitole 4.12.2 a následné stanovení zastoupení fosfolipidových hlav bylo popsáno v kapitole 4.12.3.



**Obr. 19** Tenkovrstevná chromatografie (TLC) – analýza fosfolipidů *B. subtilis* 168. A: detekce fosfolipidů parami jódu, B: detekce aminoskupin ninhydrinem. Nanáška lipidového extraktu do bodu. lysylPG – lysylfosfatidylglycerol, PS – fosfatidylserin, PG – fosfatidylglycerol, PE – fosfatidyletanolamin, CL – kardiopolin, PA – kyselina fosfatidová, KO – kontrola.



**Obr. 20** Relativní zastoupení fosfolipidových tříd cytoplazmatické membrány *B. subtilis*. Součet obsahu přítomných fosfolipidových tříd v jednotlivých vzorcích je roven 100 %. lysylPG – lysylfosfatidylglycerol, PS – fosfatidylserin, PG – fosfatidylglycerol, PE – fosfatidyletanolamin, CL – kardiolipin, PA – kyselina fosfatidová. Hodnoty byly získány ze dvou nezávislých izolací lipidů a analýz.

Výsledek dělení na chromatografické desce je dokumentován na Obr. 19. Kvalitativně se analyzované vzorky neliší. Obr. 20 je přehledem výsledků kvantitativní analýzy fosfolipidů *B. subtilis*. Z grafu je patrné, že v cytoplazmatické membráně této bakterie je zastoupeno celkově šest fosfolipidových tříd. Fosfolipidy izolované z kontrolních buněk mají v membráně majoritně zastoupen fosfatidylglycerol (PG), jehož celkový podíl tvoří 44 %. Jeho obsah v membráně je významným způsobem ovlivněn koncentrací surfaktinu přítomného v médiu. Při stimulační koncentraci surfaktinu došlo k poklesu obsahu PG na 19 % a u inhibiční koncentrace klesl jeho podíl na 31 %.

Druhým nejhojněji zastoupeným fosfolipidem membrány *B. subtilis* je fosfatidyletanolamin (PE), který je v kontrolních vzorcích zastoupen ve 24 %. Při působení surfaktinu ve stimulační koncentraci se jeho zastoupení téměř nemění a jeho podíl činí 22 %. Proti tomu u inhibiční koncentrace surfaktinu dochází k navýšení podílu PE na 39 %, který se tak stává majoritní složkou lipidů membrány. U obsahu fosfatidylserinu (PS) a kardiolipinu (CL) jsou změny v zastoupení vlivem surfaktinu méně výrazné. PS je v kontrolních a

stimulačních vzorcích zastoupen shodně v 15 %, naopak u inhibiční koncentrace surfaktinu dochází k mírnému poklesu na 11 %. U CL dochází u stimulační koncentrace surfaktinu k mírnému nárůstu z původních 12 % odpovídajících kontrole na 16 %, u inhibice naopak dochází k mírnému poklesu proti kontrole na 9 %.

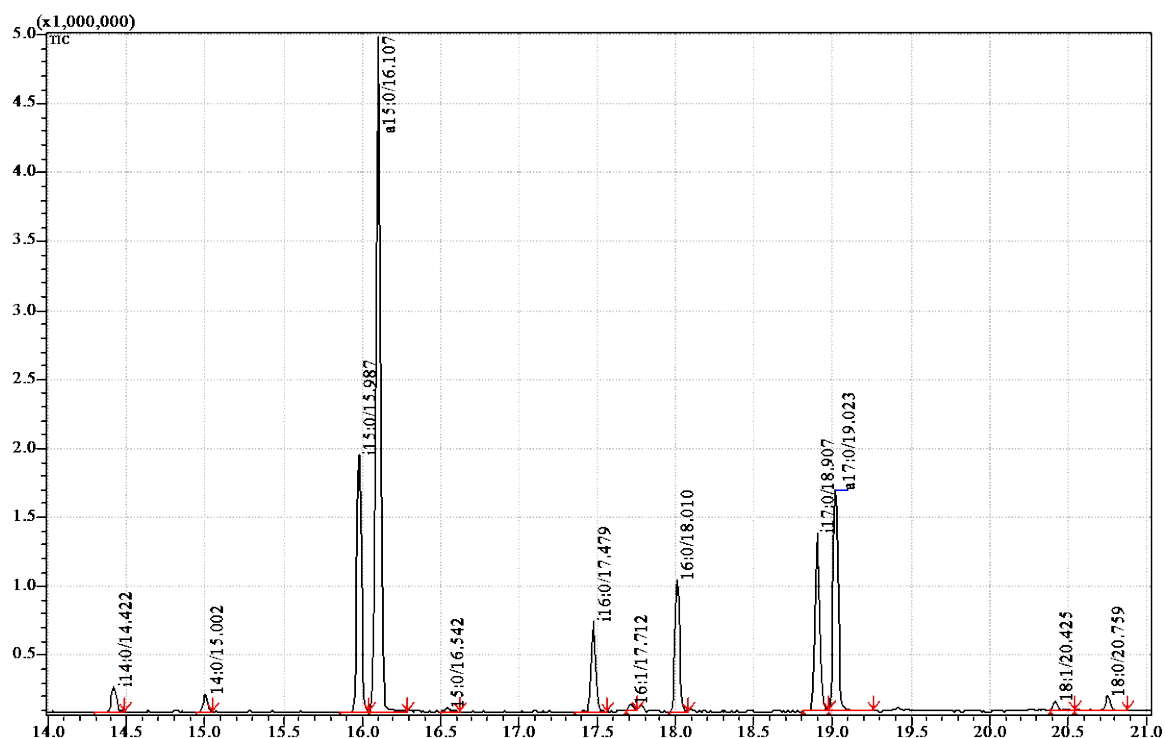
Minoritními fosfolipidovými třídami jsou v kontrolních vzorcích lysylfosfatidylglycerol (lysylPG) a kyselina fosfatidová (PA), jejichž zastoupení se v obou případech pohybuje kolem 3 %. U vzorků vystavených stimulační koncentraci dochází u lysylPG k mírnému nárůstu zastoupení na 5 %, ale hlavně k výraznému nárůstu PA na 23 %, kdy je tento prekurzor syntézy fosfolipidů zastoupen ve vzorku stejným dílem jako PE. U vzorků získaných z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu dochází u lysylPG k nárůstu zastoupení na 9 % a naopak k mírnému poklesu PA na 1 %.

Lze tedy uzavřít, že stimulační i inhibiční koncentrace surfaktinu podstatně ovlivňují zastoupení fosfolipidových tříd cytoplazmatické membrány *B. subtilis*.

#### **5.4.2 Složení mastných kyselin cytoplazmatické membrány**

Složení fosfolipidů cytoplazmatické membrány velmi významně ovlivňuje míru interakce surfaktinu s cílovou membránou. Kromě polárních hlav fosfolipidů a jejich celkového zastoupení v membráně hrají důležitou roli ve stabilitě cytoplazmatické membrány i mastné kyseliny (MK) fosfolipidů. Délka řetězců mastných kyselin membrány ovlivňuje penetraci surfaktinu (viz kapitola 3.4), ale také spolu s nasyceností či nenasyceností a typem větvení řetězce má zásadní vliv na rigiditu membrány, kterou surfaktin rovněž ovlivňuje (viz kapitola 3.4). Proto byla snaha získat přehled o případných změnách v proporcích MK bakteriální membrány vystavené účinku surfaktinu.

Mastné kyseliny fosfolipidů izolovaných z bakteriálních buněk vystavených působení inhibiční (650 µg/ml) a stimulační (350 µg/ml) koncentraci surfaktinu byly převedeny na methylestery mastných kyselin a analyzovány metodou plynové chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií (GC/MS, viz kapitola 4.12.4). Jako kontrolní vzorky byly použity lipidové izoláty z buněk rostoucích na pevné půdě bez přítomnosti surfaktinu. Typický chromatogram methylesterů mastných kyselin z kontrolní kultury je zobrazen na Obr. 21. Celkové výsledky analýzy všech vzorků jsou uvedeny v Tab. 4.



**Obr. 21** Chromatogram analýzy methylesterů mastných kyselin *B. subtilis*. Osa x udává retenční čas (min) a osa y intenzitu signálu (arbitrary units). Celkový součet všech ploch peaků na obrázku ohraničených červenými šipkami je roven 100 %. U každého vrcholu intenzity je uvedena zkratka odpovídající jednotlivým methylesterům mastných kyselin (typ větvení, počet uhlíků v řetězci, popř. přítomnost dvojné vazby) a jejich retenční čas (min). i – iso, a – anteiso – typ větvení mastné kyseliny.

**Tab. 4** Zastoupení mastných kyselin cytoplazmatické membrány *B. subtilis* (v % celkového zastoupení). Součet všech mastných kyselin přítomných ve vzorku odpovídá 100 %. Hodnoty v tabulce byly získány ze dvou nezávislých izolací lipidů a měření.

Název mastné kyseliny	Zkratka	Kontrola	650 µg/ml	350 µg/ml
12-tridecanoate	i14:0	1,5	1,5	1,3
Tetradecanoate	14:0	1,0	1,7	3,4
13-tetradecanoate	i15:0	15,2	18,1	11,8
12-tetradecanoate	a15:0	42,0	43,7	33,9
Pentadecanoate	15:0	0,3	0,6	—
14-pentadecanoate	i16:0	5,4	3,8	3,6
9-hexadecenoate	16:1	0,3	3,0	2,1
Hexadecanoate	16:0	7,9	10,2	18,7
15-hexadecanoate	i17:0	11,1	5,9	6,7
14-Hexadecanoate	a17:0	14,1	9,4	11,6
Octadecenoate	18:1	0,7	1,0	2,8
Octadecanoate	18:0	1,0	1,8	6,1
Větvené MK		89	82	68
Nevětvené MK		11	18	32

Z Tab. 4 je patrné, že hlavní komponentou membrány *B. subtilis* za kontrolních podmínek (agarové plotny bez surfaktinu) jsou větvené mastné kyseliny s délkou řetězce 15 a 17 uhlíků (větvené iso- a anteiso-MK). Celkový podíl větvených mastných kyselin v membráně činí celkem 89 %, zatímco nevětvené mastné kyseliny tvoří 11 %. Majoritní mastnou kyselinu membrány představuje a15:0, která je zastoupena ve 42 %. Dalšími významnými mastnými kyselinami jsou opět větvené mastné kyseliny, a to i15:0, a17:0 a i17:0, jejichž podíl tvoří dohromady dalších 40 % všech mastných kyselin membrány. Nevětvené mastné kyseliny jsou zastoupeny celkem z 11 %, z toho 8 % tvoří mastná kyselina 16:0. Průměrná délka řetězce mastných kyselin v případě kontrolní membrány činila 15,7 uhlíků.

U vzorků mastných kyselin lipidů izolovaných z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu (650 µg/ml) k podstatnějším změnám ve složení nedochází. Pouze u mastné kyseliny i17:0 dochází k poklesu jejího obsahu asi o polovinu – podíl se sníží z 11 % na 6 %. Menší změny je možné pozorovat v zastoupení mastných kyselin a17:0 a i15:0. Množství a17:0 poklesne v důsledku účinku surfaktinu ze 14 % na 9 % a naopak množství i15:0 stoupá ve srovnání s kontrolou z 15 % na 18 %. Majoritní mastnou kyselinou v tomto případě zůstává a15:0, jejíž množství se v porovnání s kontrolou nemění. Celkově však dochází k mírnému poklesu zastoupení větvených mastných kyselin proti kontrole. V tomto případě tvoří větvené mastné kyseliny 82 % z celku, což je pokles o 7 % ve srovnání s kontrolou. Průměrná délka řetězců mastných kyselin se u těchto vzorků v porovnání s kontrolou nemění a činí 15,6 uhlíků.

Po vystavení buněk stimulační koncentraci surfaktinu (350 µg/ml) byly pozorovány celkově výraznější změny ve složení mastných kyselin. Došlo k podstatnému poklesu podílu větvených mastných kyselin, jejichž zcela majoritní podíl v membráně je naprosto charakteristický pro membránu *B. subtilis*. Ve srovnání s kontrolou poklesl podíl větvených MK o 21 %, a to na 68 %. Tím pádem došlo k nárůstu proporce nevětvených mastných kyselin, jejichž podíl činil 32 %. Nejvýraznější změna byla pozorována u majoritní mastné kyseliny a15:0, kdy došlo k jejímu poklesu ze 42 % na 34 %. Naopak významně vzrostl podíl nevětvených mastných kyselin 16:0 a 18:0 z 8 % na 19 %, resp. z 1 % na 6 % celku. Menší změny v zastoupení byly zaznamenány u iso-větvených mastných kyselin i15:0 a i17:0, kdy došlo k poklesu jejich podílu z 15 % na 12 %, resp. z 11 % na 7 %. V případě těchto vzorků došlo k mírnému nárůstu průměrné délky řetězce mastných kyselin na 16,1 uhlíků.

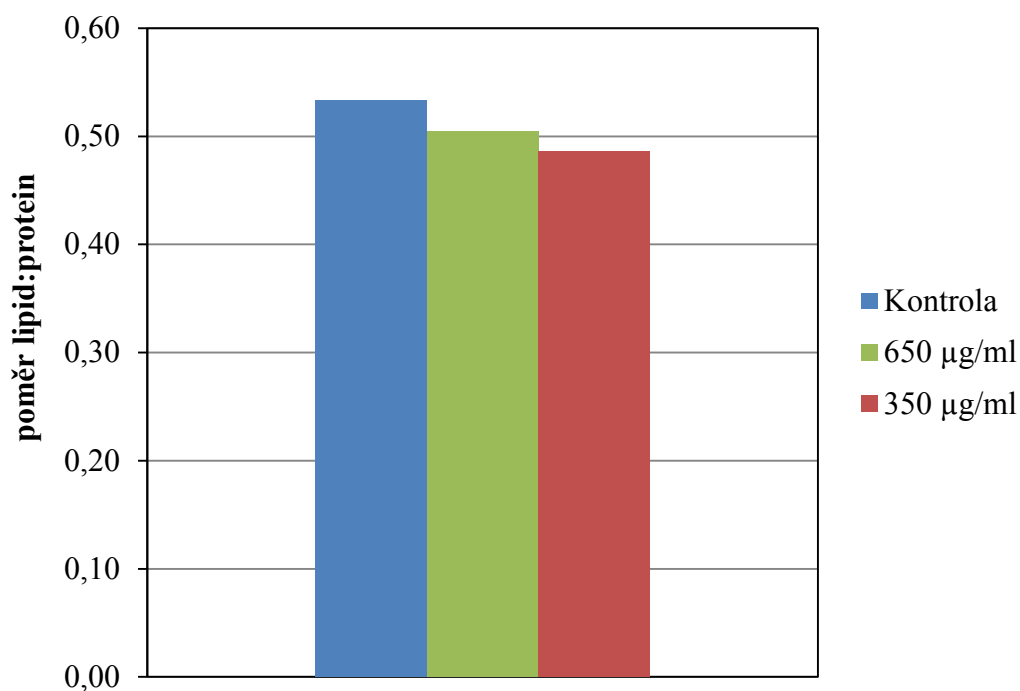
Lze tedy uzavřít, že nižší koncentrace surfaktinu má celkově výraznější vliv na složení mastných kyselin v cytoplazmatické membráně. Dochází k významnému poklesu množství větvených mastných kyselin a naopak k nárůstu podílu nevětvených mastných kyselin.

### **5.4.3 Stanovení poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně**

Další sledovanou vlastností membrány *B. subtilis*, u které byla předpokládána změna vlivem přítomnosti surfaktinu v kultivačním médiu, byl vzájemný poměr lipidového a proteinového zastoupení. Přesněji byla sledována případná změna poměru mezi lipidy a proteiny tvořícími membránu. Zvýšený podíl lipidové složky v membráně by vedl k poklesu  $R_b$  parametru (viz kapitola 3.4) a tím by se zmírnil poškozující účinek surfaktinu na membránu. Změna poměru lipid-protein se navíc podílí na změně fluidity cytoplazmatické membrány, která byla zkoumána dále (viz kapitola 5.4.5).

Pro stanovení poměru lipid-protein v membráně byly použity izolované cytoplazmatické membrány (viz kapitola 4.12.5) buněk vystavených inhibiční (650 µg/ml) a stimulační (350 µg/ml) koncentraci surfaktinu. Jako kontrolní vzorky byly použity izoláty cytoplazmatických membrán bakterií rostoucích na agarových plotnách bez surfaktinu. V suspenzi izolovaných membrán byla zároveň stanovena koncentrace bílkovin (viz kapitola 4.12.5.1) a po mineralizaci vzorku také koncentrace fosfátu, z níž bylo spočítáno množství fosfolipidů v izolovaných membránách (Obr. 22).





**Obr. 22** Poměr lipid:protein v cytoplazmatické membráně *B. subtilis*. Množství lipidu (µg) připadajících na 1 µg proteinu v cytoplazmatické membráně. Hodnoty jsou průměrem ze dvou nezávislých měření.

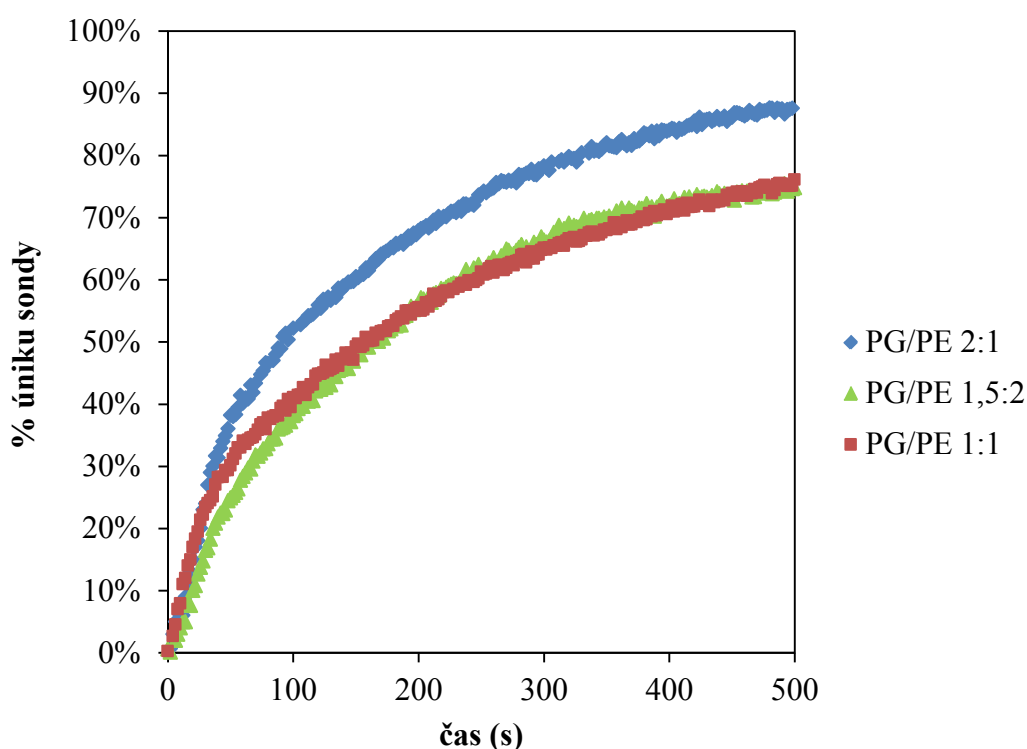
Z Obr. 22 je patrné, že u cytoplazmatických membrán získaných z buněk rostoucích na agarových plotnách bez surfaktinu připadá na 1 µg proteinů 0,53 µg fosfolipidů. Při kultivaci buněk na pevné půdě s inhibiční koncentrací surfaktinu (650 µg/ml) dochází pouze k mírnému poklesu zastoupení lipidové složky na 0,50 µg na 1 µg proteinů. Cytoplazmatické membrány izolované z buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu (350 µg/ml) mají opět podobné složení, kdy na 1 µg proteinů připadá 0,49 µg fosfolipidů.

Lze tedy konstatovat, že různé koncentrace surfaktinu v kultivačním médiu nemají vliv na celkový podíl lipidů a proteinů v membráně.

#### 5.4.4 Lyze lipozómů

Změny ve složení hlavních fosfolipidových tříd (PG a PE) cytoplazmatické membrány buněk vystavených účinku surfaktinu vedly k otázce, zda se jedná o adaptivní změny ve složení lipidů membrány, které mohou ovlivňovat míru permeabilizace membrány surfaktinem. Z výsledků analýzy zastoupení fosfolipidových tříd (viz kapitola 5.4.1) je zřejmé, že membrána *B. subtilis* obsahuje za kontrolních podmínek tyto majoritní fosfolipidy

v poměru PG/PE 2:1. U kultury vystavené inhibiční koncentraci surfaktinu se tento poměr mění ve prospěch PE a poměr činí PG/PE 1,5:2. U lipidové frakce získané z buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu je situace podobná, tj. podíly obou sledovaných komponent membrány se vyrovnávají – poměr PG/PE je roven 1:1. Na základě těchto výsledků byly připraveny tři směsi syntetických lipidů DPPG a DPPE v poměrech, které měly simulovat dané zastoupení hlavních komponent fosfolipidů membrány *B. subtilis*. Ze směsí fosfolipidů byly připraveny lipozomy plněné fluorescenční sondou carboxyfluorescein postupem popsáním v kapitole 4.12.6. Následně byl měřen v čase únik fluorescenční sondy z váčků účinkem surfaktinu (Obr. 23).



**Obr. 23** Vliv složení lipidů membrány na míru lyze lipozómů po přidavku 10  $\mu$ M surfaktinu.

Z výsledků na Obr. 23 je zřejmé, že surfaktin narušuje lipozomy a způsobuje únik fluorescenční sondy, která je do nich uzavřena. Kinetika lyze lipozómů je i v přítomnosti 10  $\mu$ M koncentrace surfaktinu velmi rychlá, u žádného ze vzorků však nebylo dosaženo úplné lyze všech lipozómů. U lipozómů vytvořených z DPPG/DPPE v poměru 2:1, který odpovídá složení kontrolní membrány, bylo dosaženo asi 88% lyze.

Zvýšení podílu DPPE v membráně na poměr DPPG/DPPE 1,5:2, což odpovídá složení lipidů cytoplazmatické membrány buněk vystavené inhibiční (650  $\mu$ g/ml) koncentraci

surfaktinu, mírně snižuje počáteční rychlost lyze a vede k redukci maximální lyze všech lipozómů, a to na 75 %. Shodný průběh kinetiky lyze byl pozorován u lipozómů vytvořených z DPPG/DPPE v poměru 1:1, který odpovídá složení lipidů v cytoplazmatické membráně buněk vystavených stimulační (350  $\mu\text{g/ml}$ ) koncentraci surfaktinu. U tohoto typu lipozómů bylo dosaženo stejného maximálního procenta lyze jako u DPPG/DPPE 1,5:2.

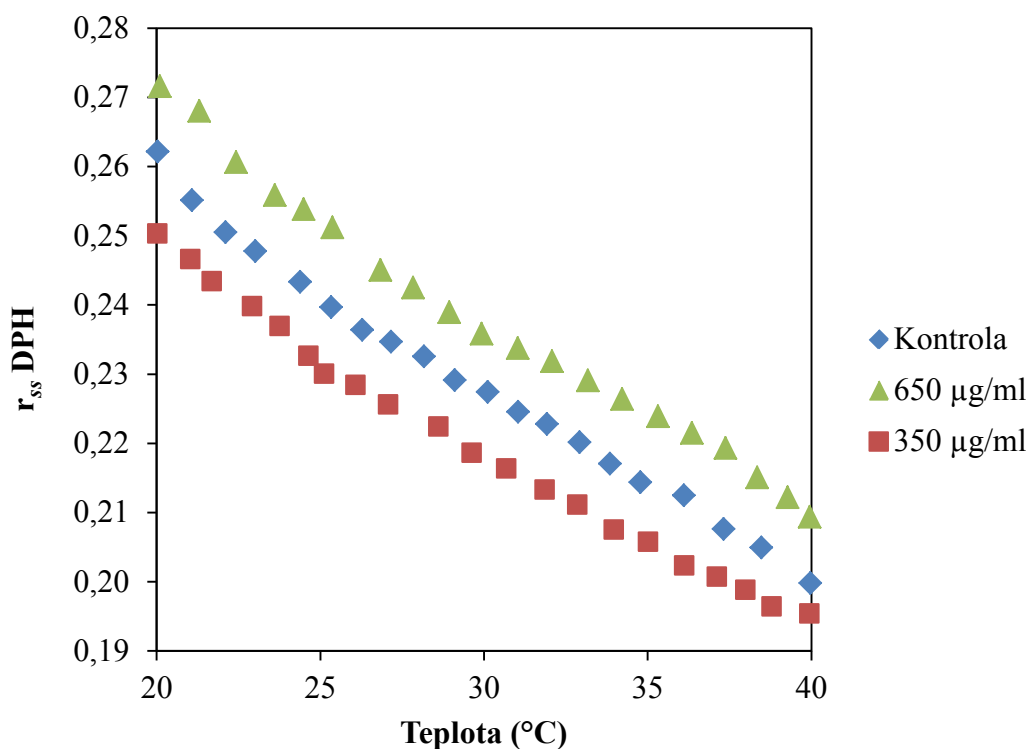
Závěrem lze tedy shrnout, že různý poměr DPPG a DPPE ovlivňuje míru permeabilizace lipozómů surfaktinem. Při poklesu podílu DPPG v membráně a tedy při zvýšení podílu DPPE se účinek surfaktinu oslabuje.

#### **5.4.5 Stanovení ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH**

Metoda měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH ( $r_{ss}$  DPH) byla použita pro vzorky cytoplazmatických membrán (viz kapitola 4.12.5) a lipidové frakce (viz kapitola 4.12.1). Pro porovnání rozdílů ve fyzikálních vlastnostech membrán byly použity izoláty z buněk vystavených účinkům surfaktinu, resp. buněk kontrolních získaných z agarových ploten bez surfaktinu. Měření probíhalo v rozmezí teplot 20 – 40 °C. Cílem pokusů bylo zjistit, zda se adaptivní změny ve složení mastných kyselin (viz kapitola 5.4.2) projeví na fluiditě intaktních cytoplazmatických membrán, resp. lipidové frakce membrány.

##### **5.4.5.1 $r_{ss}$ DPH v izolovaných cytoplazmatických membránách**

Cytoplazmatické membrány získané z bakteriálních buněk byly připraveny pro měření podle postupu v kapitole 4.12.7. Výsledky analýzy jsou shrnuty v grafu na Obr. 24.



**Obr. 24** Ustálená anizotropie fluorescence DPH značených cytoplazmatických membrán *B. subtilis* v závislosti na teplotě měření.

Z Obr. 24 je zřejmé, že u cytoplazmatických membrán získaných z kontrolních bakteriálních buněk podle předpokladu dochází k postupnému snižování hodnoty ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH, tj. zvyšování fluidity membrány, se vzrůstající teplotou měření (20 – 40 °C).  $r_{ss}$  DPH ve 30 °C, tj. teplotě rovné kultivační, dosahuje hodnoty 0,227.

U cytoplazmatických membrán z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu byly pozorovány výrazně vyšší hodnoty  $r_{ss}$  DPH, tj. vyšší rigidita membrány, než u kontrolních cytoplazmatických membrán. Při porovnání hodnoty  $r_{ss}$  DPH ve 30 °C, která odpovídá teplotě kultivace buněk, byl pozorován výrazný rozdíl mezi oběma vzorky. Při této teplotě byla naměřena hodnota  $r_{ss}$  DPH 0,227 u kontrolních membrán a u vzorků z membrán vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu byla  $r_{ss}$  DPH stanovena na hodnotu 0,236. Tento rozdíl mezi oběma membránami je konstantní v celé teplotní škále měření a cytoplazmatická membrána bakterií vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu je tedy rigidnější ve srovnání s kontrolními cytoplazmatickými membránami.

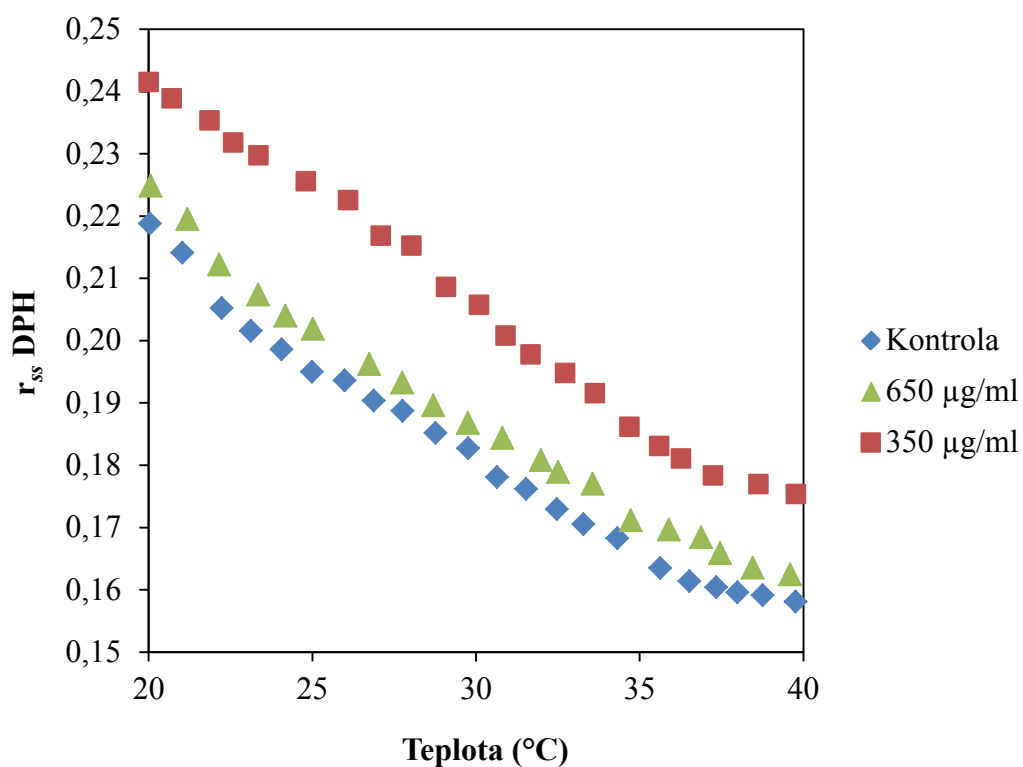
Opačných výsledků bylo dosaženo u vzorků získaných z buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu. V porovnání s cytoplazmatickými membránami získanými

z kontrolních buněk došlo k poklesu hodnoty  $r_{ss}$  DPH při 30 °C, a to na hodnotu 0,216. Ve srovnání s kontrolními cytoplazmatickými membránami byly tyto cytoplazmatické membrány v celé teplotní škále fluidnější.

Účinek surfaktinu má výrazný vliv na fluiditu cytoplazmatické membrány buněk *B. subtilis*. Cytoplazmatické membrány buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu mají vyšší rigiditu než membrána buněk kontrolních. Naopak buňky rostoucí v přítomnosti surfaktinu způsobující stimulaci růstu mají nitro membrány fluidnější oproti kontrole.

#### 5.4.5.2 $r_{ss}$ DPH v izolované lipidové frakci membrány

Lipidové frakce získané z cytoplazmatických membrán bakteriálních buněk byly připraveny pro měření podle postupu v kapitole 4.12.7. Výsledky analýzy jsou shrnuty v grafu na Obr. 25.



**Obr. 25** Ustálená anizotropie fluorescence DPH značené lipidové frakce *B. subtilis* v závislosti na teplotě měření.

Při porovnání hodnot  $r_{ss}$  DPH získaných v izolovaných cytoplazmatických membránách a lipidové frakce (Obr. 24 a 25) je patné, že samotná lipidová frakce (tj. bez proteinové komponenty membrány) je fluidnější než intaktní cytoplazmatické membrány. Z Obr. 25 je zřejmé, že u lipidové frakce získané z kontrolních bakteriálních buněk dochází opět k postupnému snižování rigidity membrány se vzrůstající teplotou (20 – 40 °C).  $r_{ss}$  DPH ve 30 °C, tj. teplotě rovné kultivační, dosahuje hodnoty 0,187.

U vzorků lipidů získaných z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu byla tentokrát v celé teplotní škále měření pozorována téměř totožná fluidita jako u kontrolní lipidické frakce. Při porovnání hodnoty  $r_{ss}$  DPH ve 30 °C byl pozorován pouze velmi malý rozdíl mezi oběma vzorky. Při této teplotě byla naměřena hodnota  $r_{ss}$  DPH 0,187 u kontrolních membrán a u vzorků z membrán vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu byla naměřena hodnota  $r_{ss}$  DPH 0,183. V celé teplotní škále je tak fluidita v oblasti řetězců mastných kyselin obou lipidových frakcí téměř identická.

Naopak u lipidové frakce získané z buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu byla pozorována výrazně nižší fluidita než u kontrolních vzorků. Hodnota  $r_{ss}$  DPH při teplotě 30 °C stoupla na hodnotu 0,206. Tzn., že ve srovnání s kontrolní lipidovou frakcí jsou tyto lipidy v celé teplotní škále mnohem rigidnější.

Účinek surfaktinu výrazně ovlivňuje rigidity lipidové frakce membrány pouze u buněk vystavených stimulační koncentraci surfaktinu. Naopak na lipidovou frakci izolovanou z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu nemá téměř žádný vliv ve srovnání s kontrolou. Tyto výsledky velmi dobře korelují s přítomností (surfaktin 350 µg/ml), resp. nepřítomností (surfaktin 650 µg/ml) adaptivních změn na úrovni mastných kyselin, jejichž oblast sonda DPH monitoruje.

## 6 DISKUZE

Stále stoupající výskyt kmenů bakterií rezistentních ke konvenčním antibiotikům vede ke snaze neustále zdokonalovat, vyvíjet a uvádět do praxe nové druhy antibiotik. Mezi látky s vysokým potenciálem využití jakožto nových terapeutických agens patří i lipopeptid surfaktin. Jeho případné uvedení do komerčního použití však omezuje několik faktorů, mezi něž patří i neznalost mechanismu rezistence k surfaktinu. Antibiotika mohou působit i na samotné producenty a ti tedy musejí mít vyvinuté obranné mechanismy, jak se vlastnímu toxickému produktu bránit. V případě surfaktinu dosud mechanismus rezistence nebyl zcela objasněn. Jeho determinace je ale neopomenutelným předpokladem pro možné využití surfaktinu v lékařství, protože u patogenů se může vyvinout stejný mechanismus rezistence, jaký používají právě producenti antibiotik. Obecně může být rezistence k antibiotiku realizována jeho inaktivací, snižováním koncentrace pomocí efluxní pumpy nebo změnou zásahového místa.

Možný podíl na rezistenci bakterie *Bacillus subtilis* 168 k surfaktinu byl popsán u genu *yerP* (*swrC*) kódujícího homolog proteinu RND (resistance, nodulation and cell division) rodiny multidrogových efluxních pump. Avšak inaktivací tohoto genu byly získány buňky, které byly schopné přežívat v přítomnosti surfaktinu o koncentraci 10 mg/ml, což ukazuje na existenci dalších možných mechanismů rezistence (Tsuge *et al.* 2001). Naše pozornost se proto zaměřila na cytoplazmatickou membránu jakožto zásahové místo surfaktinu, a její lipidickou složku, která podle *in vitro* studií významně ovlivňuje míru interakce surfaktinu s membránou (viz kapitola 3.4).

Cytoplazmatická membrána a její adaptační mechanismy k účinkům surfaktinu se staly předmětem studia této diplomové práce. K tomuto účelu byl použit neprodukční kmen surfaktinu bakterie *B. subtilis* 168, která byla vystavena účinkům surfaktinu dodaného z vnějšku do kultivačního média. Buňky byly účinkům surfaktinu vystaveny v době exponenciálního růstu kultury. I když se jedná o odlišnou situaci od působení surfaktinu na produkční kmen, který je surfaktinu vystaven od přechodu do stacionární fáze růstu, kdy je zahajována syntéza tohoto antibiotika, poskytuje exponenciální fáze růstu na rozdíl od stacionární fáze fyziologicky homogenní populaci buněk a odpověď na surfaktin lze tak přesněji definovat.

Vzhledem k nemožnosti kultivace buněk v tekutém médium, a to z důvodu srážení surového surfaktinu (Stružinská 2010), bylo nutné nejprve ověřit, že kultura *B. subtilis* roste

exponenciálně i na pevném médiu. Na tomto typu média se problém se srážením surfaktinu neobjevuje a metanol jako solvent surfaktinu je účinně odstraněn inkubací ještě horkého agaru při 70 °C (viz kapitola 4.3.2). Sledováním růstu na pevné půdě se podařilo prokázat schopnost buněk růst exponenciálně na tomto typu média s reprodukovatelnou dobou zdvojení  $T = 53$  min.

Surfaktin byl získáván izolací z kultury *B. subtilis* ATCC 21332. Vzhledem k vysoké spotřebě surfaktinu pro jednotlivé pokusy byla snaha optimalizovat izolaci toho lipopeptidu a zvýšit celkové výtěžky. Celkem byly testovány tři druhy médií – médium dle Coopera (Cooper *et al.* 1981), médium dle Coopera s přidavkem aktivního uhlí (Yeh *et al.* 2005) a médium dle Coopera se zvýšenou koncentrací železnatých iontů (Wei *et al.* 2003). Dle Yeh *et al.* (2005) složení média dle Coopera s přidavkem aktivního uhlí přispívá k vyšší produkci surfaktinu, kdy je možné z toho typu média izolovat až 3600 mg surfaktinu na 1 litr média. Námi získaný výtěžek dosahoval množství pouze 2,41 mg surfaktinu na 1 litr média. Nepodařilo se nám tedy reprodukovat publikovaná data. Důvodem nižšího zisku surfaktinu by mohla být případná vazba surfaktinu na povrch aktivního uhlí, kde by bakterie měly růst formou biofilmu. Před izolací surfaktinu jsou však buňky i částice aktivního uhlí sedimentovány centrifugací, a tudíž může docházet ke ztrátám ještě před začátkem izolace (Liu *et al.* 2007; Montastruc *et al.* 2008).

Dalším testovaným médiem bylo médium se zvýšenou koncentrací železnatých iontů. Podle publikace Wei *et al.* (2003) je možné z toho média izolovat 1500 mg surfaktinu z 1 litru média. Testováním tohoto média nebylo však publikovaných hodnot dosaženo, výtěžek dosáhl množství 0,02 mg/l surfaktinu. Už během kultivace se vyskytly problémy s růstem kultury, kdy doba zdvojení byla vysoká a bylo vůbec obtížné přesně změřit optickou denzitu kultury a určit tak dobu zdvojení. Je pravděpodobné, že buňky tedy nedosahovaly nezbytné hustoty populace pro syntézu surfaktinu nebo došlo k poklesu pH pod hodnotu pH 6 a vzniku sraženiny, která je těžko odlišitelná od sraženiny železa (Wei & Chu 1998). Případně mohlo dojít k vazbě surfaktinu na sraženinu železa a tím i ke snížení účinku extrakce stejně, jako tomu bylo u média s přidavkem aktivního uhlí.

Posledním médiem bylo tradičně používané médium pro produkci surfaktinu médium dle Coopera (Cooper *et al.* 1981). Podle Isa *et al.* (2008) lze z tohoto média získat až 583 mg/l surfaktinu. Námi získané množství surfaktinu se pohybovalo průměrně kolem 300 mg/l. Nižší výtěžek surfaktinu byl zřejmě způsoben menší účinností extrakce a ztrátami během



izolace. Podařilo se nám ovšem zvýšit účinnost extrakce a celkový výtěžek surfaktinu proti předešlým výsledkům získaným v naší laboratoři (Stružinská 2010). V uvedené práci bylo dosaženo průměrných výtěžků pouze kolem 90 mg/l surfaktinu, což je množství, které se nám podařilo více než ztrojnásobit.

Klíčovou podmínkou pro sledování vlivu izolovaného surfaktinu na složení a vlastnosti cytoplazmatické membrány *B. subtilis* bylo najít takový poměr inokula a koncentrace surfaktinu, která měřitelně ovlivní růst, ale buňky budou stále v dostatečné fyziologické kondici a dorostou do takové denzity, aby bylo možné je analyzovat. Námi zvolený limit byl 30% úbytek biomasy oproti kontrole po 14 h kultivace.

K prvotnímu stanovení užšího rozmezí koncentrací surfaktinu a velikosti inokula byl použit kapkový test, a to z důvodu nižší spotřeby surfaktinu a možnosti najednou otestovat větší rozpětí koncentrací surfaktinu a velikostí inokula. Při stálé koncentraci surfaktinu a snižující se velikosti inokula byly zaznamenány nižší nárůsty buněk, což naznačuje vyšší citlivost buněk k surfaktinu. Při zachování velikosti inokula a zvyšující se koncentraci surfaktinu byly pozorovány změny ve velikosti kolonií, kdy se zvyšující se koncentrací roste i velikost kolonie. To bylo způsobeno nejen tím, že došlo ke snížení povrchového napětí vody v kapce bakteriální suspenze, ale také skutečně větším množstvím biomasy buněk v kolonii. Tímto pokusem byla potvrzena závislost účinku surfaktinu na jeho koncentraci a na počtu buněk, resp. molekul fosfolipidů v cytoplazmatických membránách, se kterými interaguje. Čím nižší je počet molekul lipidů, které interagují s daným počtem molekul surfaktinu, tím je destabilizující účinek surfaktinu na membránu silnější (Heerklotz & Seelig 2007).

Proto bylo dále nutné ověřit, jakých nárůstů biomasy bude dosaženo při klasickém uspořádání pokusu, kdy je inokulum rovnoměrně naočkováno po celé ploše média. V následujících pokusech byly tedy kapičky inokula rozetřeny po celé ploše média. V porovnání s předešlým uspořádáním pokusu byly zaznamenány nižší nárůsty buněk u stejných koncentrací surfaktinu a velikostí inokula. Je tomu tak právě v důsledku rozetření inokula po povrchu agaru, kdy byly buňky v tomto případě účinněji vystaveny působení surfaktinu a došlo ke zvýšení jejich letality. Na základě obou typů pokusů byl stanoven užší rozsah koncentrací surfaktinu na 300 – 650 µg/ml a velikost inokula  $10^7$  buněk.

Cílem následujících pokusů bylo ze získaného rozmezí koncentrací surfaktinu 300 – 650 µg/ml stanovit přesnou koncentraci, která by u buněk *B. subtilis* vyvolala 30% inhibici růstu. Výsledkem pokusů bylo zjištění, že rozmezí koncentrací surfaktinu 300 – 500 µg/ml

vede k vyšším nárůstům biomasy buněk, tj. ke stimulaci růstu buněk, a rozmezí koncentrací 550 – 650  $\mu\text{g/ml}$  naopak růst buněk inhibuje. Hranice mezi stimulací a inhibicí se tedy pohybuje ve velmi úzkém rozmezí mezi 500 – 550  $\mu\text{g}$  surfaktinu/ml. Míra stimulace se u uvedených hodnot pohybuje mezi 20 – 40 %. Pro další růstové pokusy byly vybrány dvě subletální koncentrace, a to 350  $\mu\text{g/ml}$ , která zvyšuje finální nárůst biomasy o 30 %, a 650  $\mu\text{g/ml}$ , která snižuje celkový nárůst biomasy oproti kontrole o 30 %.

Obě bakteriální kultury po přeočkování na pevnou půdu se surfaktinem, na rozdíl od půd kontrolních, prochází lag fází. Stimulační koncentrace surfaktinu vyvolává 40 minutovou lag fází a podle očekávání inhibiční koncentrace surfaktinu vyvolává lag fází delší, a to v délce 3 hodin, což svědčí o skutečnosti, že pro buňky představuje přítomnost surfaktinu velkou fyziologickou zátěž. Během této doby buňky zastavují svůj růst a dochází při ní k adaptaci buněk na vzniklé podmínky. Po lag fází se růst obnoví se změněnou dobou zdvojení. U stimulační koncentrace je doba zdvojení o 20 % rychlejší než za kontrolních podmínek. Inhibiční koncentrace surfaktinu 650  $\mu\text{g/ml}$  prodlužuje dobu zdvojení více než dvojnásobně ve srovnání s kontrolou. Je tedy pozoruhodné, že surfaktin jakožto antimikrobiální látka je schopen za určitých podmínek stimulovat růst buněk. Je možné se domnívat, že stimulace růstu by mohla být způsobena snížením povrchového napětí a tím i lepší dostupností živin pro bakterie. Dále by mohlo dojít ke spuštění signálních drah, běžně aktivovaných ve stacionární fázi růstu, a tím k aktivaci např. kanibalismu, popř. produkce extracelulární matrix a následně i lepšímu přežití za nastalých podmínek (Rosenberg & Ron 1999; López *et al.* 2009b).

Pozorované výrazné změny v růstu buněk vystavených surfaktinu, vedly k zamyšlení nad obranným mechanismem buněk k surfaktinu. Vzhledem k interakci surfaktinu s cytoplazmatickou membránou buněk, bylo předpokladem, že buňka se nastalému stresu bude bránit právě na úrovni zásahového místa. Aby buňka zachovala celkovou integritu membrány, která je pro bakteriální buňku jedinou strukturou svého druhu, předpokládali jsme, že dojde ke změnám nejpravděpodobněji na úrovni lipidů, které jsou schopny ovlivnit míru interakce surfaktinu s cytoplazmatickou membránou. Tento stejný mechanismus rezistence na úrovni změn složení fosfolipidů byl pozorován u *B. subtilis* 168 vůči působení antibiotika daptomycinu. Daptomycin patří stejně jako surfaktin mezi cyklické lipopeptidy a jeho zásahovým místem je stejně jako u surfaktinu cytoplazmatická membrána (Hachmann *et al.* 2011). Analýza lipidové frakce cytoplazmatické membrány *B. subtilis* po účincích surfaktinu prokázala podstatné změny v zastoupení polárních hlav fosfolipidů. Dominantním

fosfolipidem v kontrolní membráně je PG, který je zastoupen ve 44 %, za ním následuje PE s 24 %. Zastoupení těchto dvou fosfolipidů v membráně je tedy PG/PE 2:1.

Stimulační koncentrace surfaktinu má za následek výrazný pokles PG ze 44 % na 19 %, který se tak dostává na úroveň PE, který je v membráně zastoupen ve 22 %, stejně jako je tomu u kontrolní membrány. Poměr těchto dvou fosfolipidů se tedy v tomto případě vyrovná a odpovídá PG/PE 1:1. Podobné změny byly pozorovány i v případě rezistence k lipopeptidu daptomycinu, kde došlo k pětinasobnému snížení množství PG v cytoplazmatické membráně (Hachmann *et al.* 2011). Během stimulace růstu naopak dochází k výraznému nárůstu PA, která je prekurzorem syntézy fosfolipidů. Její množství stoupá ze 3 % na 24 %. Podobných výsledků bylo dosaženo i při analýze fosfolipidů producenta surfaktinu *B. subtilis* ATCC 21332, jehož membrána obsahuje až 36 % PA, což svědčí o velké zásahu do biosyntézy fosfolipidů. (Seydlova *et al.* 2013). Lze ovšem i spekulovat, že záporně nabitá PA zvyšuje celkový negativní náboj na membráně, která může elektrostaticky odpuzovat stejně nabitý surfaktin. Již krátce po objevení surfaktinu byla v roce 1970 prokázána schopnost PA výrazně oslabovat hemolytické účinky surfaktinu na červené krvinky (Bernheim & Avigad 1970), zvýšení podílu PA v membráně by tak mohlo být jednou ze strategií bakteriální buňky jak zabránit lyzi buňky po působení surfaktinu. Úlohu PA v adaptaci k surfaktinu by mohla ověřit metoda měření kinetiky lyze lipozómů, která v této práci byla použita pro sledování role PG a PE (viz níže).

U buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu byla pozorována zcela odlišná strategie. Sice opět došlo k poklesu PG z 44 % tentokrát na 31 %, ale došlo k výraznému nárůstu PE z původních 24 % na 39 %. Celkový poměr PG/PE tak odpovídal hodnotě 1,5:2. Zvýšení syntézy PE způsobuje mírný pokles PS, který je prekurzorem syntézy PE. Zvýšení podílu PE bylo pozorováno i u bakterie *B. stearothermophilus* po vystavení účinku xenobiotik, kdy bakterie v důsledku adaptace cytoplazmatické membrány ztrojnásobila množství PE (Donato *et al.* 2000). K výraznému nárůstu dále došlo také u lysylPG, jehož množství se ztrojnásobilo ze 3 % na 9 %. Na základě zjištěných výsledků lze konstatovat, že předpoklad, že může existovat mechanismus rezistence na úrovni adaptace lipidů cytoplazmatické membrány, je v tomto případě zřejmě odůvodněný.

Na základě pozorovaných výrazných změn v zastoupení majoritních fosfolipidů membrány bylo dalším cílem práce ověřit, zda tyto modifikace mohou být účinnou adaptací membrány proti působení surfaktinu. Byly tedy připraveny lipidové váčky z čistých

syntetických lipidů o složení PG a PE v takových poměrech, které odpovídá hodnotám získaným analýzou polárních hlav fosfolipidů. Po přidání 10  $\mu$ M surfaktinu je počáteční kinetika lyze, sledovaná jako únik fluorescenční sondy carboxyfluorescein z lipozómů v čase, poměrně rychlá. V případě podmínek stimulace (PG/PE 1:1) a inhibice (PG/PE 1,5:2) byla počáteční rychlost lyze oproti kontrole (PG/PE 2:1) pomalejší. Vyrovnáním poměru PG/PE v membráně tak dochází ke snížení účinku surfaktinu na membránu, a to i na úrovni maximálně dosažené míry lyze. V případě kontroly došlo k lyzi 88 % lipozómů a v případě stimulace a inhibice došlo k lyzi 75 % lipozómů. V práci Carrillo *et al.* (2003) byl pomocí lyze lipozómu plněných fluorescenční sondou carboxyfluorescein prokázán stabilizační účinek PE na cytoplazmatickou membránu vůči účinkům surfaktinu. Molekula PE se vyznačuje geometricky opačnou strukturou než surfaktin. Oba mají tvar kužele, avšak PE oslabuje účinek surfaktinu pravděpodobně neutralizací invertovaného kónusu surfaktinu.

Podle *in vitro* studie na modelové membráně (Shen *et al.* 2010) interaguje surfaktin primárně s oblastí polárních hlav fosfolipidů a s přiléhající částí mastných kyselin. Strategii buňky by navíc asi mělo být zabránit toxickému agens proniknout až do nitra membrány. To může být důvodem skutečnosti, že byly na úrovni polárních hlav pozorovány mnohem razantnější změny než ve složení mastných kyselin. V případě kontrolních vzorků tvoří větvené mastné kyseliny v membráně bakterie *B. subtilis* majoritní část, celkem jsou zastoupené v 89 %, zatímco nevětvené mastné kyseliny tvoří pouhých 11 %. Po vystavení buněk inhibiční koncentraci surfaktinu je poměr větvených a nevětvených mastných kyselin téměř zachován, z čehož lze usuzovat, že se fyzikální vlastnosti lipidů membrány nemění. Tomu odpovídají i výsledky získané z měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH, která monitoruje právě oblast řetězců mastných kyselin. Byla pozorována totožná fluidita lipidové složky cytoplazmatických membrán ve vzorcích získaných z kontrolních buněk a z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu.

Naopak při působení stimulační koncentrace surfaktinu na bakterie dochází k podstatnému poklesu větvených mastných kyselin, jejichž podíl klesne z 89 % na 68 %, v tom případě dojde k nárůstu nevětvených mastných kyselin z 11 % na 32 %. Nárůst nevětvených mastných kyselin v membráně, které se oproti větveným mastným kyselinám vyznačují vyšší teplotou tání, má za následek vyšší mikroviskozitu lipidické složky cytoplazmatické membrány. K té může přispívat i prodloužení průměrné délky řetězce mastných kyselin v membráně o půl uhlíku ve srovnání s kontrolou, protože s rostoucí délkou řetězce mastné kyseliny se zvyšuje jejich teplota tání. Toto prodloužení může mít vliv i na

sníženou interakci surfaktinu s membránou, jelikož surfaktin lépe interaguje s kratšími řetězci mastných kyselin (Maget-Dana & Ptak 1995; Bouffieux *et al.* 2007).

Snížená fluidita lipidové složky membrány se potvrdila i ve výsledcích z měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH, která dosahovala ve srovnání s kontrolou vyšších hodnot, které vypovídají o snížené mobilitě sondy v oblasti rovných řetězců mastných kyselin a tedy vyšší rigiditě této oblasti membrány. Kontrolní membrána dosahovala při teplotě 30 °C hodnoty  $r_{ss}$  DPH 0,183, této hodnoty bylo u membrány vystavené stimulační koncentraci surfaktinu dosaženo až při teplotě o 6 °C vyšší, to je při 36 °C. Podobný mechanismus byl objeven u bakterie *Pseudomonas putida*, která byla vystavena účinkům toluenu v kultivačním médiu. Působením tohoto rozpouštědla dochází k nárůstu nevětvených mastných kyselin a ke snížení fluidity cytoplazmatické membrány (Ramos *et al.* 1997).

Měření ustálené anizotropie fluorescence sondy DPH zabudované v intaktních membránách přineslo odlišné výsledky od samotné lipidové frakce. Zde se na celkové fluiditě membrány podílí nejen lipidická frakce, ale také membránové proteiny, jejichž přítomnost zvyšuje rigiditu membrány. Kontrolní cytoplazmatické membrány dosahovaly při teplotě 30 °C hodnoty  $r_{ss}$  DPH 0,227. Cytoplazmatické membrány získané z buněk vystavených stimulační koncentraci se v tomto případě jevily ve srovnání s kontrolou výrazně fluidnější, hodnoty  $r_{ss}$  DPH 0,227 dosahovaly už při teplotě 26 °C. Naopak v případě inhibičních podmínek vykazovaly membrány nižší fluiditu oproti kontrole, kdy hodnoty  $r_{ss}$  DPH 0,227 dosahovaly až při teplotě 34 °C. Zvýšení rigidity cytoplazmatické membrány by mohlo být považováno za adaptivní strategii vůči účinku surfaktinu, který svým působením fluidizuje membránu (Deleu *et al.* 2013). Rozdílné výsledky fluidity intaktních cytoplazmatických membrán a samotné lipidové složky, musí být dány skladbou proteinové složky cytoplazmatické membrány. Tomu ovšem neodpovídají výsledky ze stanovení poměru lipidů a proteinů, kdy u všech třech typů membrán nedošlo k významným změnám tohoto poměru. V případě intaktních cytoplazmatických membrán by bylo nutné jednak zopakovat měření, ale také provést podrobnou analýzu membránového proteomu a zjistit případnou spojitost s rezistencí k surfaktinu.

Doposud získaná data však dokazují, že *Bacillus subtilis* je schopen odolávat koncentracím surfaktinu, které jsou pro bakterie jiných druhů letální. Odolnost *B. subtilis* vůči surfaktinu je dána změnou zastoupení PG a PE, případně změnou délky řetězců mastných kyselin, které mají výrazný vliv na fluiditu membrány.

## 7 SOUHRN

- Bakterie *B. subtilis* 168 roste v tekutém médiu i na pevné půdě exponenciálně. Doba zdvojení se u obou médií liší – v tekutém médiu  $T = 33$  min, na pevné půdě  $T = 53$  min, ale počet generací, které vzniknou za dobu exponenciálního růstu, je stejný.
- Byla optimalizována metoda izolace surfaktinu z kultury produkčního kmene *B. subtilis* ATCC 21332. Jednotlivé izoláty se vyznačovali vysokou reprodukovatelností co se chemického složení a množství surfaktinu týče. Celkem bylo ze šesti izolátů získáno 3304 mg surfaktinu.
- Pomocí kapkového testu byla prokázána závislost účinku surfaktinu na počtu buněk a na koncentraci surfaktinu. Byla stanovena optimální velikost inokula  $10^7$  buněk a užší koncentrační rozmezí surfaktinu 300 - 650  $\mu\text{g/ml}$  pro sledování vlivu surfaktinu na růst *B. subtilis*.
- Na základě kultivací bakterií na pevném médiu se surfaktinem byly vybrány dvě subletální koncentrace surfaktinu, a to 650  $\mu\text{g/ml}$ , která způsobuje inhibici růstu, a 350  $\mu\text{g/ml}$ , která působí na růst kultury stimulačně.
- Buňky rostoucí na pevné půdě s inhibiční koncentrací surfaktinu 650  $\mu\text{g/ml}$  procházejí nejprve 3 hodinou lag fází a následně začínají exponenciálně růst s dobou zdvojení  $T = 126$  min. Buňky vystavené stimulační koncentraci surfaktinu 350  $\mu\text{g/ml}$ , procházejí nejprve 40 min lag fází a následně exponenciálně rostou s dobou zdvojení  $T = 44$  min.
- Surfaktin vyvolává adaptivní změny ve složení polárních hlav fosfolipidů v cytoplazmatické membráně *B. subtilis* 168. Zastoupení majoritního PG klesá z kontrolních 44 % na 31 % za inhibičních podmínek, resp. na 19 % za stimulačních podmínek. Podíl PE se v případě stimulačních podmínek nemění, u inhibičního růstu dojde k nárůstu z 24 % na 39 %. Pokles PG u stimulačního růstu na polovinu proti kontrole je kompenzován nárůstem PA ze 3 % na 23 %.
- *B. subtilis* 168 na přítomnost surfaktinu reaguje na úrovni mastných kyselin výrazněji v případě stimulační koncentrace surfaktinu (350  $\mu\text{g/ml}$ ). Dochází k výraznému poklesu větvených mastných kyselin a naopak k nárůstu podílu nevětvených mastných kyselin. Naopak v případě inhibiční koncentrace (650  $\mu\text{g/ml}$ ) se zastoupení mastných kyselin nemění.
- Stanovením poměru lipid:protein v cytoplazmatické membráně bylo zjištěno, že surfaktin nemá vliv na celkový podíl lipidů a proteinů v membráně.

- Měřením kinetiky lyze lipozómů bylo prokázáno, že snížením podílu PG a zvýšením podílu PE v membráně dochází k oslabení účinku surfaktinu na permeabilizaci membrány.
- Izoláty cytoplazmatických membrán z buněk *B. subtilis* vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu mají nižší fluiditu než membrány z kontrolních buněk. Naopak cytoplazmatické membrány získané z buněk po účincích stimulační koncentrace surfaktinu jsou oproti kontrole výrazně fluidnější.
- Lipidová frakce membrány získaná z buněk vystavených inhibiční koncentraci surfaktinu má ve srovnání s kontrolou stejnou fluiditu. Naopak došlo ke snížení fluidity lipidové frakce membrány získané z buněk po účincích stimulační koncentrace surfaktinu.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdel-Mawgoud, A. M., M. M. Aboulwafa and N. A. H. Hassouna (2008). "Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **150**(3): 289-303.

Arutchelvi, J., J. Sangeetha, J. Philip and M. Doble (2014). "Self-assembly of surfactin in aqueous solution: Role of divalent counterions." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **116**: 396-402.

Bais, H. P., R. Fall and J. M. Vivanco (2004). "Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production." *Plant Physiol* **134**(1): 307-319.

Banat, I. M. (1995). "Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil-recovery and oil pollution remediation - a review." *Bioresource Technology* **51**(1): 1-12.

Banat, I. M., R. S. Makkar and S. S. Cameotra (2000). "Potential commercial applications of microbial surfactants." *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**(5): 495-508.

Bernheim, A. W. and L. S. Avigad (1970). "Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*." *Journal of General Microbiology* **61**: 361-&.

Bisschop, A. and W. N. Konings (1976). "Reconstitution of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase Activity with Menadione in Membrane Vesicles from the Menaquinone-Deficient *Bacillus subtilis* AroD." *European Journal of Biochemistry* **67**(2): 357-365.

Bouffieux, O., A. Berquand, M. Eeman, M. Paquot, Y. F. Dufrêne, R. Brasseur and M. Deleu (2007). "Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: Effect of phospholipid chain length and polar head." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**(7): 1758-1768.

Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick and R. Kolter (2001). "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(20): 11621-11626.

Brasseur, R., N. Braun, K. El Kirat, M. Deleu, M.-P. Mingeot-Leclercq and Y. F. Dufrêne (2007). "The Biologically Important Surfactin Lipopeptide Induces Nanoripples in Supported Lipid Bilayers." *Langmuir* **23**(19): 9769-9772.



Buchoux, S., J. Lai-Kee-Him, M. Garnier, P. Tsan, F. Besson, A. Brisson and E. J. Dufourc (2008). "Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: A novel membrane-lysis mechanism." *Biophysical Journal* **95**(8): 3840-3849.

Cameotra, S. S. and R. S. Makkar (2004). "Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules." *Current Opinion in Microbiology* **7**(3): 262-266.

Cao, X.-h., A.-h. Wang, C.-l. Wang, D.-z. Mao, M.-f. Lu, Y.-q. Cui and R.-z. Jiao (2010). "Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway." *Chemico-Biological Interactions* **183**(3): 357-362.

Carrillo, C., J. A. Teruel, F. J. Aranda and A. Ortiz (2003). "Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1611**(1-2): 91-97.

Cooper, D. G., C. R. Macdonald, S. J. B. Duff and N. Kosaric (1981). "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions." *Applied and Environmental Microbiology* **42**(3): 408-412.

Das, P., S. Mukherjee and R. Sen (2008). "Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*." *Journal of Applied Microbiology* **104**(6): 1675-1684.

Deleu, M., O. Bouffieux, H. Razafindralambo, M. Paquot, C. Hbid, P. Thonart, P. Jacques and R. Brasseur (2003). "Interaction of surfactin with membranes: A computational approach." *Langmuir* **19**(8): 3377-3385.

Deleu, M., J. Lorent, L. Lins, R. Brasseur, N. Braun, K. El Kirat, T. Nylander, Y. F. Dufrêne and M.-P. Mingeot-Leclercq (2013). "Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**(2): 801-815.

Dogsa, I., K. S. Choudhary, Z. Marsetic, S. Hudaiberdiev, R. Vera, S. Pongor and I. Mandic-Mulec (2014). "ComQXPA Quorum Sensing Systems May Not Be Unique to *Bacillus subtilis*: A Census in Prokaryotic Genomes." *Plos One* **9**(5).

Donato, M. M., A. S. Jurado, M. C. Antunes-Madeira and V. M. C. Madeira (2000). "Membrane lipid composition of *Bacillus stearothermophilus* as affected by lipophilic environmental pollutants: An approach to membrane toxicity assessment." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**(2): 145-153.

Dufour, S., M. Deleu, K. Nott, B. Wathelet, P. Thonart and M. Paquot (2005). "Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties." *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **1726**(1): 87-95.

Fan, H. Y., M. Nazari, G. Raval, Z. Khan, H. Patel and H. Heerklotz (2014). "Utilizing zeta potential measurements to study the effective charge, membrane partitioning, and membrane permeation of the lipopeptide surfactin." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**(9): 2306-2312.

Farace, G., O. Fernandez, L. Jacquens, F. Coutte, F. Krier, P. Jacques, C. Clément, E. Ait Barka, C. Jacquard and S. Dorey (2014). "Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine." *Molecular Plant Pathology*: n/a-n/a.

Fehri, L. F., H. Wroblewski and A. Blanchard (2007). "Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(2): 468-474.

Ghelardi, E., S. Salvetti, M. Ceragioli, S. A. Gueye, F. Celandroni and S. Senesi (2012). "Contribution of Surfactin and SwrA to Flagellin Expression, Swimming, and Surface Motility in *Bacillus subtilis*." *Applied and Environmental Microbiology* **78**(18): 6540-6544.

Grau, A., J. C. G. Fernandez, F. Peypoux and A. Ortiz (1999). "A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1418**(2): 307-319.

Gudina, E. J., V. Rangarajan, R. Sen and L. R. Rodrigues (2013). "Potential therapeutic applications of biosurfactants." *Trends in Pharmacological Sciences* **34**(12): 667-675.

Hachmann, A.-B., E. Sevim, A. Gaballa, D. L. Popham, H. Antelmann and J. D. Helmann (2011). "Reduction in Membrane Phosphatidylglycerol Content Leads to Daptomycin Resistance in *Bacillus subtilis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**(9): 4326-4337.

Hamon, M. A. and B. A. Lazazzera (2001). "The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*." *Molecular Microbiology* **42**(5): 1199-1209.

Heerklotz, H. and J. Seelig (2001). "Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes." *Biophysical Journal* **81**(3): 1547-1554.

Heerklotz, H. and J. Seelig (2007). "Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin." *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **36**(4-5): 305-314.

Hwang, M. H., M. H. Kim, E. Gebru, B. Y. Jung, S. P. Lee and S. C. Park (2008). "Killing rate curve and combination effects of surfactin C produced from *Bacillus subtilis* complex BC1212 against pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae*." World Journal of Microbiology & Biotechnology **24**(10): 2277-2282.

Isa, M. H. M., R. A. Frazier and P. Jauregi (2008). "A further study of the recovery purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration." Separation and Purification Technology **64**(2): 176-182.

Julkowska, D., M. Obuchowski, I. B. Holland and S. J. Seror (2005). "Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: Critical effects of surfactin and the composition of the medium." Journal of Bacteriology **187**(1): 65-76.

Kakinuma, A., M. Hori, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969a). "Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 971-&.

Kakinuma, A., M. Hori, H. Sugino, I. Yoshida, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969b). "Determination of location of lactone ring in surfactin." Agricultural and Biological Chemistry **33**(10): 1523-&.

Kakinuma, A., A. Ouchida, T. Shima, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969c). "Confirmation of structure of surfactin by mass spectrometry." Agricultural and Biological Chemistry **33**(11): 1669-&.

Kakinuma, A., H. Sugino, M. Isono, G. Tamura and K. Arima (1969d). "Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of total structure of surfactin." Agricultural and Biological Chemistry **33**(6): 973-&.

Kearns, D. B., F. Chu, R. Rudner and R. Losick (2004). "Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility." Molecular Microbiology **52**(2): 357-369.

Kell, H., J. F. Holzwarth, C. Boettcher, R. K. Heenan and J. Vater (2007). "Physicochemical studies of the interaction of the lipopeptide surfactin with lipid bilayers of 1- $\alpha$ -dimyristoyl phosphatidylcholine." Biophysical Chemistry **128**(2-3): 114-124.

Kim, H. S., B. D. Yoon, C. H. Lee, H. H. Suh, H. M. Oh, T. Katsuragi and Y. Tani (1997). "Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9." Journal of Fermentation and Bioengineering **84**(1): 41-46.

Kim, P. I., J. Ryu, Y. H. Kim and Y.-T. Chl (2010). "Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*." *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**(1): 138-145.

Kim, S.-y., J. Y. Kim, S.-H. Kim, H. J. Bae, H. Yi, S. H. Yoon, B. S. Koo, M. Kwon, J. Y. Cho, C.-E. Lee and S. Hong (2007). "Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression." *Febs Letters* **581**(5): 865-871.

Kinsinger, R. F., D. B. Kearns, M. Hale and R. Fall (2005). "Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*." *Journal of Bacteriology* **187**(24): 8462-8469.

Kinsinger, R. F., M. C. Shirk and R. Fall (2003). "Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion." *Journal of Bacteriology* **185**(18): 5627-5631.

Kluge, B., J. Vater, J. Salnikow and K. Eckart (1988). "Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332." *Febs Letters* **231**(1): 107-110.

Knoblich, A., M. Matsumoto, R. Ishiguro, K. Murata, Y. Fujiyoshi, Y. Ishigami and M. Osman (1995). "Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **5**(1-2): 43-48.

Koglin, A., F. Loehr, F. Bernhard, V. V. Rogov, D. P. Frueh, E. R. Strieter, M. R. Mofid, P. Guentert, G. Wagner, C. T. Walsh, M. A. Marahiel and V. Doetsch (2008). "Structural basis for the selectivity of the external thioesterase of the surfactin synthetase." *Nature* **454**(7206): 907-U968.

Kolter, R. (2010). "Biofilms in lab and nature: a molecular geneticist's voyage to microbial ecology." *International Microbiology* **13**(1): 1-7.

Kracht, M., H. Rokos, M. Ozel, M. Kowall, G. Pauli and J. Vater (1999). "Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives." *Journal of Antibiotics* **52**(7): 613-619.

Lai, C.-C., Y.-C. Huang, Y.-H. Wei and J.-S. Chang (2009). "Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil." *Journal of Hazardous Materials* **167**(1-3): 609-614.

Levine, J. H., M. E. Fontes, J. Dworkin and M. B. Elowitz (2012). "Pulsed Feedback Defers Cellular Differentiation." *Plos Biology* **10**(1).

Li, M., Y. Rharbi, X. Huang and M. Winnik (2000). "Small variations in the composition and properties of Triton X-100." *Journal of Colloid and Interface Science* **230**(1): 135-139.

Liu, T., L. Montastruc, F. Gancel, L. Zhao and I. Nikov (2007). "Integrated process for production of surfactin - Part 1: Adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon." *Biochemical Engineering Journal* **35**(3): 333-340.

López, D., M. A. Fischbach, F. Chu, R. Losick and R. Kolter (2009a). "Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(1): 280-285.

López, D. and R. Kolter (2010). "Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*." *Fems Microbiology Reviews* **34**(2): 134-149.

López, D., H. Vlamakis, R. Losick and R. Kolter (2009b). "Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*." *Molecular Microbiology* **74**(3): 609-618.

López, D., H. Vlamakis, R. Losick and R. Kolter (2009c). "Paracrine signaling in a bacterium." *Genes & Development* **23**(14): 1631-1638.

Maget-Dana, R. and M. Ptak (1995). "Interactions of surfactin with membrane models." *Biophysical Journal* **68**(5): 1937-1943.

Marahiel, M. A., T. Stachelhaus and H. D. Mootz (1997). "Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis." *Chemical Reviews* **97**(7): 2651-2673.

Menkhaus, M., C. Ullrich, B. Kluge, J. Vater, D. Vollenbroich and R. M. Kamp (1993). "Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system." *Journal of Biological Chemistry* **268**(11): 7678-7684.

Mireles, J. R., A. Toguchi and R. M. Harshey (2001). "*Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation." *Journal of Bacteriology* **183**(20): 5848-5854.

Montastruc, L., T. Liu, F. Gancel, L. Zhao and I. Nikov (2008). "Integrated process for production of surfactin: Part 2. Equilibrium and kinetic study of surfactin adsorption onto activated carbon." *Biochemical Engineering Journal* **38**(3): 349-354.

Mulligan, C. N. (2005). "Environmental applications for biosurfactants." *Environmental Pollution* **133**(2): 183-198.

Nakano, M. M., N. Corbell, J. Besson and P. Zuber (1992). "Isolation and characterization of *sfpA* gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis* ." *Molecular & General Genetics* **232**(2): 313-321.

Nicolas, J. P. (2003). "Molecular dynamics simulation of surfactin molecules at the water-hexane interface." *Biophysical Journal* **85**(3): 1377-1391.

Nitschke, M., L. V. Araujo, S. G. V. A. O. Costa, R. C. Pires, A. E. Zeraik, A. C. L. B. Fernandes, D. M. G. Freire and J. Contiero (2009). "Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces." *Letters in Applied Microbiology* **49**(2): 241-247.

Nitschke, M. and S. G. V. A. O. Costa (2007). "Biosurfactants in food industry." *Trends in Food Science & Technology* **18**(5): 252-259.

Park, S. Y., J.-H. Kim, S. J. Lee and Y. Kim (2013a). "Involvement of PKA and HO-1 signaling in anti-inflammatory effects of surfactin in BV-2 microglial cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* **268**(1): 68-78.

Park, S. Y., J.-H. Kim, S. J. Lee and Y. Kim (2013b). "Surfactin exhibits neuroprotective effects by inhibiting amyloid beta-mediated microglial activation." *Neurotoxicology* **38**: 115-123.

Perkowski, J., J. Mayer and S. Ledakowicz (1995). "Determination of critical micelle concentration of nonionic surfactants using kinetic approach." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **101**(1): 103-106.

Peypoux, F., J. M. Bonmatin and J. Wallach (1999). "Recent trends in the biochemistry of surfactin." *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(5): 553-563.

Porrini, M. P., M. Carina Audisio, D. C. Sabate, C. Ibarguren, S. K. Medici, E. G. Sarlo, P. M. Garrido and M. J. Eguaras (2010). "Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*." *Parasitology Research* **107**(2): 381-388.

Radin, N. S. (1981). Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Methods in Enzymology*. M. L. John, Academic Press. **Volume 72**: 5-7.

Ramos, J. L., E. Duque, J. J. RodriguezHerva, P. Godoy, A. Haidour, F. Reyes and A. Fernandez Barrero (1997). "Mechanisms for solvent tolerance ill bacteria." *Journal of Biological Chemistry* **272**(7): 3887-3890.

Rodrigues, L., I. M. Banat, J. Teixeira and R. Oliveira (2006). "Biosurfactants: potential applications in medicine." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**(4): 609-618.

Rosenberg, E. and E. Z. Ron (1999). "High- and low-molecular-mass microbial surfactants." *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**(2): 154-162.

Rouser, G., S. Fleischer and A. Yamamoto (1970). "Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots." *Lipids* **5**(5): 494-496.

Sachdev, D. P. and S. S. Cameotra (2013). "Biosurfactants in agriculture." *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**(3): 1005-1016.

Seydlova, G., R. Fiser, R. Cabala, P. Kozlik, J. Svobodova and M. Patek (2013). "Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1828**(11): 2370-2378.

Shen, H.-H., R. K. Thomas, C.-Y. Chen, R. C. Darton, S. C. Baker and J. Penfold (2009). "Aggregation of the Naturally Occurring Lipopeptide, Surfactin, at Interfaces and in Solution: An Unusual Type of Surfactant?†." *Langmuir* **25**(7): 4211-4218.

Shen, H.-H., R. K. Thomas and P. Taylor (2010). "The Location of the Biosurfactant Surfactin in Phospholipid Bilayers Supported on Silica Using Neutron Reflectometry." *Langmuir* **26**(1): 320-327.

Shinitzky, M. and Y. Barenholz (1974). "Dynamics of the Hydrocarbon Layer in Liposomes of Lecithin and Sphingomyelin Containing Dicetylphosphate." *Journal of Biological Chemistry* **249**(8): 2652-2657.

Shinitzky, M. and Y. Barenholz (1978). "Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **515**(4): 367-394.

Schwarzer, D. and M. A. Marahiel (2001). "Multimodular biocatalysts for natural product assembly." *Naturwissenschaften* **88**(3): 93-101.

Sieber, S. A. and M. A. Marahiel (2005). "Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics." *Chemical Reviews* **105**(2): 715-738.

Stein, T. (2005). "*Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions." *Molecular Microbiology* **56**(4): 845-857.

Steller, S., A. Sokoll, C. Wilde, F. Bernhard, P. Franke and J. Vater (2004). "Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein." *Biochemistry* **43**(35): 11331-11343.

Stružinská, O. (2010). Adaptace cytoplazmatické membrány neprodukčního kmene *Bacillus subtilis* 168 k surfaktinu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Praha.

Symmank, H., P. Franke, W. Saenger and F. Bernhard (2002). "Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase." *Protein Engineering* **15**(11): 913-921.

Tsan, P., L. Volpon, F. Besson and J. M. Lancelin (2007). "Structure and dynamics of surfactin studied by NMR in micellar media." *Journal of the American Chemical Society* **129**(7): 1968-1977.

Tsuge, K., Y. Ohata and M. Shoda (2001). "Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**(12): 3566-3573.

Vollenbroich, D., M. Ozel, J. Vater, R. M. Kamp and G. Pauli (1997a). "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*." *Biologicals* **25**(3): 289-297.

Vollenbroich, D., G. Pauli, M. Ozel and J. Vater (1997b). "Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(1): 44-49.

Wei, Y.-H. and I. M. Chu (1998). "Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332." *Enzyme and Microbial Technology* **22**(8): 724-728.

Wei, Y. H., L. F. Wang, J. S. Chang and S. S. Kung (2003). "Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**(2): 174-178.

Yeh, M. S., Y. H. Wei and J. S. Chang (2005). "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers." *Biotechnology Progress* **21**(4): 1329-1334.



Zhang, W., A. Seminara, M. Suaris, M. P. Brenner, D. A. Weitz and T. E. Angelini (2014). "Nutrient depletion in *Bacillus subtilis* biofilms triggers matrix production." *New Journal of Physics* **16**.

Zou, A., J. Liu, V. M. Garamus, Y. Yang, R. Willumeit and B. Mu (2010). "Micellization Activity of the Natural Lipopeptide [Glu1, Asp5] Surfactin-C15 in Aqueous Solution." *The Journal of Physical Chemistry B* **114**(8): 2712-2718.